

**4'-Phosphopantethein Transfer in *Bacillus subtilis* und
Pseudomonas aeruginosa sowie Grundlagen zur gerichteten
Proteinevolution von Adenylierungsdomänen der
Nichtribosomalen Peptidsynthetasen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Robert Finking

aus

Bochum

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 06.10.2003 angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. L-O. Essen

Tag der Disputation: 17.10.2003

Für Andrea und Henning...

„Imagination is more important than knowledge“
(Albert Einstein)

Ein Großteil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht, und ist unter folgenden Literaturstellen zu finden:

- Mootz, H. D. *, Finking, R. *, Marahiel, M. A. (2001). 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **276** (40), 37289-37298.
- Mofid, M. R. *, Finking R. *, Marahiel, M. A. (2002). Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem* **277** (19), 17023-17031.
- Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schäfer, A. Jahn, D., Marahiel, M. A. (2002). Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **277** (52), 50293-50302.
- Finking, R., Neumüller, A., Solsbacher, J., Konz, D., Kretzschmar, G., Schweitzer, M., Krumm, T., Marahiel, M. A. (2003). Amino acyl-adenylate substrate analogues for the inhibition of adenylation domains of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **4**, 903-906.
- Mofid, M. R., Finking, R., Essen, L.-O., Marahiel, M. A. (2003). Mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism. MS in preparation.
- Finking, R. *, May, J. J. *, Weber, T., Bandur, N., Koert, U., Marahiel, M. A. Inhibition of DltA from *Bacillus subtilis* *in vitro* and *in vivo* by D-Ala-sulfamoyl adenylate. MS in preparation.

Weitere Veröffentlichungen:

- Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M.A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **20**, 275-278.

*Diese Autoren haben gleichwertig zu dieser Publikation beigetragen.

Zusammenfassung

Carrier Proteine (CP) werden in unterschiedlichen prokaryontischen und eukaryontischen Synthesystemen als Transporteinheiten für die Syntheseintermediate eingesetzt. Im Primärmetabolismus dienen sie zum Transport von Acyleinheiten (Fettsäuresynthese) und D-Ala (Modifikation der Zellwand). Im Sekundärmetabolismus werden sie zur Beförderung von Aminoacyl/Peptidyl/Aryleinheiten (nichtribosomale Peptidsynthetasen, NRPS) und Ketoacyleinheiten (Polyketidsynthetasen) eingesetzt. Die Intermediate werden am 4'-Phosphopantethein-Cofaktor (4'PP) des CP als Thioester gebunden. Der 4'PP-Cofaktor wird posttranslational von Coenzym A auf einen konservierten Serinrest des CP übertragen, katalysiert durch sog. 4'PP-Transferasen (PPTasen).

E. coli besitzt zwei PPTasen. Die Acyl Carrier Protein Synthase (AcpS) modifiziert nur die CP des Primärmetabolismus, während EntD nur die CP des Sekundärmetabolismus bedient. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden PPTasen von *B. subtilis*, AcpS und Sfp, überlappende Spezifitäten besitzen. Es zeigte sich, dass AcpS lediglich die CP des Primärmetabolismus modifiziert, während Sfp, das zwar alle CP erkennt, jedoch deutliche Präferenz für die CP des Sekundärmetabolismus hat. In *P. aeruginosa* wurde nur eine PPTase, PcpS, gefunden. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften ist PcpS eine PPTase des Sekundärmetabolismus. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass sie, wie Sfp, alle CP modifizieren kann, jedoch evolutiv auf die Modifikation der CP des Primärmetabolismus optimiert wurde. Eine Deletion des zugehörigen Gens und RNA-*interference* zeigten, dass diese PPTase für *P. aeruginosa* essentiell ist. Weitere Untersuchung zur CP-PPTasen-Erkennung konnten außerdem die Interaktionsstelle zwischen beiden Proteinen aufdecken.

Die Inhibierung der Adenylierungsdomänen (A-Domänen) der NRPS, die für die Selektion des Aminosäuresubstrats verantwortlich sind, durch Aminoacyl-Sulfamoyl Adenylatanaloga konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich auf eine A-Domäne des Primärmetabolismus übertragen werden. Eine Modifikation dieser Inhibitoren mit einem Linker erlaubt ihre Bindung an eine Matrix. Der Linker beeinflusst die inhibitorischen Eigenschaften z.T. nicht und kann den Einsatz dieser linkermodifizierten Inhibitoren zur gerichteten Proteinevolution von A-Domänen ermöglichen. Außerdem wurde zum Zweck der Evolution von A-Domänen ein Screeningsystem entwickelt. Dieses System basiert auf der *in vivo* beobachtbaren Lumineszenz der Luciferase. Damit kann eine A-Domänenbibliothek auf veränderte Selektivität in Richtung des Substrats der Luciferase, Luciferin, durchmustert werden.

1. ABKÜRZUNGEN	11
2. EINLEITUNG	13
2.1 Thiotemplat-abhängige Biosynthesen	13
2.1.1 Die Fettsäuresynthese	13
2.1.2 Die Polyketidsynthese	14
2.1.3 Die Nichtribosomale Peptidsynthese	15
2.1.3.1 Aufbau von NRPS und Peptidsynthese am Proteintemplat	17
2.1.4 Weitere CP-abhängige Stoffwechselwege	19
2.2 Zentrale Rolle von CP und PPTasen	20
2.2.1 Die CP Superfamilie	20
2.2.2 Phosphopantetheinyl Transferasen	21
2.2.3 Katalyse und Vorkommen der AcpS- und Sfp-Typ PPTasen	24
2.2.4 Toleranz der PPTase gegenüber CoA-Derivaten	26
2.2.5 CP-PPTase Erkennung	27
2.3 NRPS A-Domänen	29
2.3.1 Die A-Domäne	29
2.3.2 Vergleich mit tRNA-Synthetasen	30
2.3.3 Inhibierung von Aminoacyl-tRNA Synthetasen	31
2.4 Aufbau und Modifikation der bakteriellen Zellwand	32
2.5 Aufgabenstellung	33
3. MATERIAL	35
3.1 Geräte	35
3.2 Enzyme und Chemikalien	37
3.3 Mikroorganismen	38
3.3.1 Klonierungsstämme	38
3.3.2 Expressionsstämme	38
3.4 Vektoren	38
3.4.1 pQE30, pQE60, pQE70	38
3.4.2 pREP4	39
3.4.3 pTZ18	39
3.4.4 pASK-IBA3	40
3.5 Medien	40
3.6 Antibiotika und Zusätze	42
4. METHODEN	43
4.1 Molekularbiologische Methoden	43
4.1.1 Plasmidkonstruktion	43
4.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese	47
4.1.3 Zufällige (<i>random</i>) Mutagenese	48
4.1.4 DNA Sequenzierung	49
4.1.5 <i>In vivo</i> Generierung von Antisense-RNA	49
4.1.6 <i>In vitro</i> Transkription und Translation	51
4.1.7 Deletion von <i>PAI165</i>	51
4.2 Proteintechniken	53
4.2.1 Genexpression	53
4.2.1.1 Expression im pQE-Vektorsystem	53
4.2.1.2 Expression im IBA-Vektorsystem	54
4.2.2 Präparation von Rohzelleextrakten	54
4.2.3 Proteinreinigung	54

4.2.3.1 Proteinreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA	54
4.2.3.2 Proteinreinigung mittels Streptactin Affinitätssäulen.....	55
4.2.3.3 Reinigung ungetagter Proteine	55
4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	56
4.2.5 Größenbestimmung von PcpS	57
4.3 Biochemische Methoden	58
4.3.1 Radioaktivassay zur Bestimmung der PPTasenaktivität	58
4.3.2 HPLC Methoden zur Bestimmung kinetischer Größen.....	58
4.3.3 ATP/PP _i -Austausch	60
4.3.4 Aminoacylierung von B.s.-ACP und DCP	61
4.3.5 Inhibierung von DltA <i>in vivo</i>	62
4.3.5 Bestimmung der Luciferaseaktivität <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	62
5. ERGEBNISSE.....	64
5.1 Phosphopantetheintransfer in B. subtilis	65
5.1.1 Produktion und Reinigung der Proteine	65
5.1.1 Produktion und Reinigung der Proteine	66
5.1.2 Proteinpartner von AcpS und Sfp	66
5.1.3 Biochemische Charakterisierung von AcpS und Sfp	67
5.1.3.1 Entwicklung einer HPLC Trennmethode für apo- und holo-CP	67
5.1.3.2 Biochemische Charakterisierung von AcpS und Sfp	68
5.1.4 AcpS-CP Wechselwirkung: Das hPCP.....	70
5.1.4.1 Heterologe Produktion und Reinigung von hPCP.....	72
5.1.4.1 Qualitative Analyse mit [³ H]-CoA	73
5.1.4.2 Biochemische Charakterisierung von AcpS und Sfp mit hPCP	73
5.1.5 Mutationsanalyse von AcpS	74
5.1.5.1 Produktion und Reinigung der AcpS Mutanten	75
5.1.5.2 Biochemische Charakterisierung der AcpS Mutanten.....	76
5.1.5.3 Untersuchung der Substratspezifität der AcpS-Mutanten	78
5.2 Phosphopantetheintransfer in P. aeruginosa.....	79
5.2.1 Auswahl, Produktion und Reinigung der Proteinsubstrate.....	81
5.2.2 Charakterisierung von PcpS	82
5.2.2.1 Posttranslationale Modifikation von CP Substraten durch PcpS <i>in vivo</i>	82
5.2.2.2 <i>In vitro</i> Untersuchungen mit [³ H]CoA	83
5.2.2.3 Biochemische Charakterisierung von PcpS.....	84
5.2.2.5 Deletion von PA1165	89
5.2.2.6 Gene Silencing von PA1165.....	91
5.2.2.7 Inhibierung von PcpS <i>in vitro</i>	92
5.3 Inhibierung von A-Domänen.....	93
5.3.2 Inhibierung von DltA.....	94
5.3.2.1 Charakterisierung von DltA.....	94
5.3.2.2 Inhibierung von DltA <i>in vitro</i>	95
5.3.2.3 Inhibierung von DltA <i>in vivo</i>	96
5.4 Vorbereitung zur gerichteten Proteinevolution von A-Domänen.....	98
5.4.1 Inhibitoren für GrsA-A und SrfA-C-A	98
5.4.2 Linkermodifizierte Inhibitoren	99
5.4.2.1 Kreuzinhibierung und Inhibitoren mit Polyether- oder Polyetherbiotinlinker.....	100
5.4.1 Zufallsmutagenese des A4-A5 Bereichs.....	102
5.4.2 <i>In vitro</i> Expression von A-Domänen.....	103
5.4.3 Luciferase: Verwendung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	104
5.4.3.1 Produktion, Reinigung und <i>in vitro</i> Aktivität der Luciferase	104

5.4.3.2 Beobachtung der Luciferaseaktivität in vivo	106
6. DISKUSSION.....	108
6.1 Phosphopantetheintransfer.....	108
6.1.1 Charakterisierung von <i>B. subtilis</i> AcpS und Sfp	109
6.1.1.1 CP-abhängige Stoffwechselwege in <i>B. subtilis</i>	109
6.1.1.2 Modifikation der CP durch AcpS und Sfp.....	109
6.1.2 Charakterisierung von PcpS	112
6.1.2.1 <i>P. aeruginosa</i> besitzt nur eine PPTase des Sfp-Typs	112
6.1.2.2 PcpS zeigt PPTase-Aktivität in vivo und in vitro.....	113
6.1.2.3 Proteinpartner von PcpS	114
6.1.2.4 PcpS ist eine PPTase des Primärmetabolismus	115
6.1.2.6 Bedeutung von PcpS für Primär- und Sekundärmetabolismus	116
6.1.2.5 PcpS als Target für Antibiotika	118
6.1.3 Evolution der PPTasen	119
6.1.4 PPTase-CP Wechselwirkung: Das hPCP	120
6.1.4.1 Konstruktion und biochemische Charakterisierung des hPCP	120
6.1.4.2 Modifikation von hPCP durch AcpS und Sfp	122
6.1.4.3 Weitergehende Untersuchungen mit hPCP	123
6.1.5 Mutationsanalyse von AcpS	124
6.1.5.1 Modell der CP Erkennung durch PPTasen.....	124
6.1.5.2 Anpassung von AcpS an das PCP Substrat	125
6.2 Inhibitoren für A-Domänen	127
6.2.1 Inhibierung der D-Alanylierung der Gram-positiven Zellwand.....	127
6.2.1.1 Charakterisierung von DltA.....	127
6.2.1.2 Inhibierung von DltA.....	128
6.2.1.3 Ausblick.....	130
6.2.2 Linkermodifizierte Inhibitoren zur gerichteten Proteinevolution.....	131
6.2.3 Die Luciferase als Testsystem zur gerichteten Proteinevolution.....	133
6.2.3.1 Charakterisierung der Luciferase aus <i>P. pyralis</i>	134
6.2.3.2 Testsystem auf Veränderung der A-Domänenselektivität.....	134
6.2.3.3 Ausblick.....	135
7. LITERATUR	137
8. ANHANG	154
8.1 Oligonukleotide	154
8.2 Sequenzen des mutagenisierten A4-A5 Bereichs von LeuA.....	159
9. DANKSAGUNG	161

1. Abkürzungen

4'PP	4'-Phosphopantethein
ACP	Acyl Carrier Protein
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
ArCP	Aryl Carrier Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A _x	Extinktion bei x nm Wellenlänge
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cat	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CoA	Coenzyme A
CP	4'PP-abhängiges Carrier Protein
cpm	Zählrate (<i>counts per minute</i>)
CV	<i>column values</i> , Säulenvolumina
Da	Dalton
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>decays per minute</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie
GFC	Gelfiltrationschromatographie
HABA	4'-Hydroxy-benzolazo-2-benzoesäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEX	Ionentauschchromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LTA	Lipoteichonsäuren
MADP	α,β-Methylenadenosin-5'-diphosphat
MCS	Polylinker (<i>multiple cloning site</i>)

min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetasen
NTA	Nitrilotriacetat
<i>ORF</i>	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
Pch	Pyochelin
PCP	Peptidyl Carrier Protein
PCR	Polymerase chain reaction
PKS	Polyketidsynthase
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PPTase	4'PP Transferase
Pvd	Pyoverdin
RBS	ribosomale Bindungsstelle
SDS	Natriumdocecylsulfat
ssDNA	<i>single stranded</i> DNA (Einzelstrang-DNA)
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
WTA	Wandteichonsäuren

2. Einleitung

2.1 Thiotemplat-abhängige Biosynthesen

2.1.1 Die Fettsäuresynthese

Fettsäuren dienen sowohl als Energiespeicher, als auch als essentieller Bestandteil von Zellmembranen. Dementsprechend kommt ihrer Biosynthese eine besondere Bedeutung im Metabolismus von Pro- und Eukaryonten zu. Die Biosynthese erfolgt ausgehend von Malonyl-CoA-Einheiten und endet gewöhnlich in Fettsäuren mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen, typischerweise zwischen 14 und 24. Am häufigsten kommen Fettsäuren mit 16-18 Kohlenstoffatomen vor, wobei die Alkylkette gesättigt sein oder ein und auch mehrere Doppelbindungen enthalten kann (1).

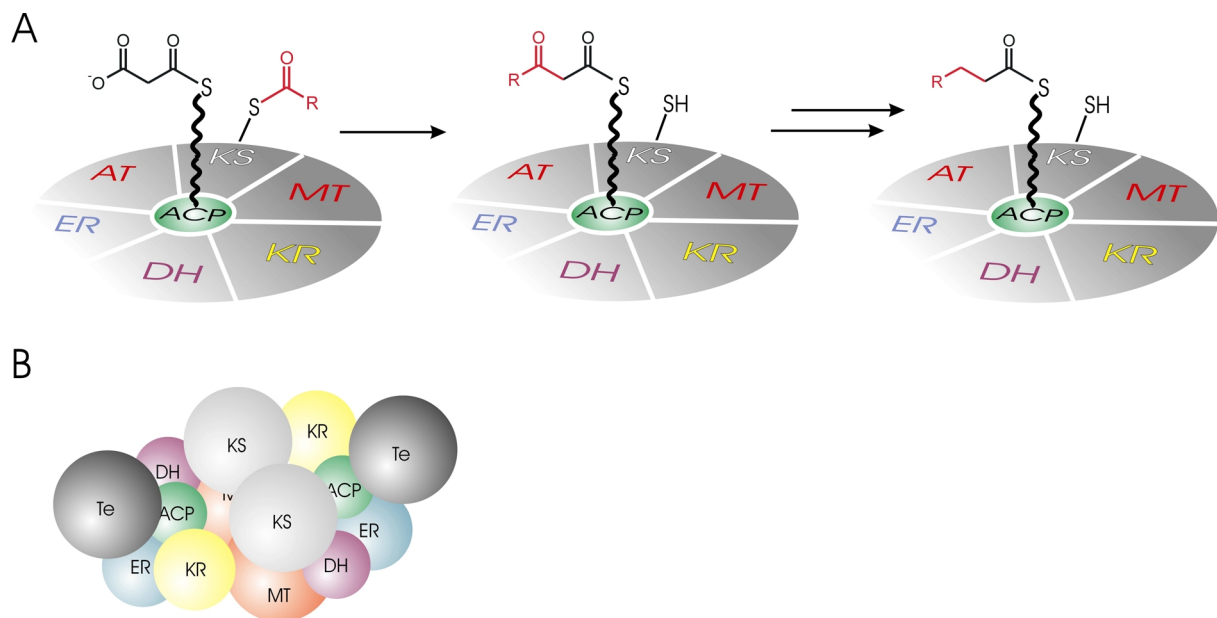


Abb. 1: Die Fettsäuresynthese **A.** Fettsäuresynthese der Prokaryonten, dargestellt ist der Multienzymkomplex. Der ACP-gebundene Malonylrest wird von der Ketosynthase (KS) mit einem Acylrest kondensiert. Anschließend wird das ACP-gebundene Intermediat zunächst von der Ketoreduktase (KR) reduziert, die Dehydratase (DH) spaltet Wasser ab und schließlich erfolgt Reduktion zur Methylgruppe durch die Enoylreduktase (ER). **B.** Fettsäuresynthese der Eukaryonten: Die enzymatischen Funktionen werden von Domänen ausgeführt, die auf einer Polypeptidkette liegen. Gezeigt ist das Dimer.

Die Fettsäurebiosynthese beginnt durch die Übertragung des durch die Biotin-Carboxylase gebildete Malonyl-CoA (2-4). Die Malonyl-Einheiten werden zunächst auf den 4'-Phosphopantetheinrest (4'PP, symbolisiert durch eine Schlangenlinie in Abb. 1 A) des *holo*-Acyl Carrier Proteins (*holo*-ACP) durch die Malonyl-CoA:ACP Transacylase übertragen (5). Die acylierte β -Ketoacyl-ACP-Synthase III katalysiert anschließend die Initiation der Kettenverlängerung durch Kondensation mit Malonyl-ACP unter CO_2 -Abspaltung, wodurch eine

Verlängerung um C_2 am ACP-gebundenen Acylrest erreicht wird (6). Es folgen eine Reihe von Syntheseschritten, in denen das ACP-gebundene Intermediat am β -Kohlenstoffatom durch die β -Ketoacyl-ACP Reduktase (KR) reduziert und anschließend durch die β -Hydroxyacyl-ACP Dehydratase (DH) dehydratisiert wird. Die Enoyl-ACP Reduktase (ER) katalysiert schließlich die Reduktion zur β - CH_2 -Gruppe. Dieser verlängerte Acyl-ACP Rest kann anschließend in weiteren Verlängerungsrunden partizipieren, an denen weitere Ketosynthasen beteiligt sind (7,8). Bei der Fettsäuresynthese (FAS) der Bakterien handelt es sich um einen Multienzymkomplex, der aus eigenständigen, hoch konservierten Enzymen besteht (9-11) (Abb. 1 A). Eukaryonten haben diese Aufgabe hingegen durch große, multifunktionale Enzyme gelöst, auf denen die einzelnen enzymatischen Funktionen von sog. Domänen ausgeführt werden, die katalytisch eigenständig sind (12-15) (Abb. 1 B).

Das zentrale Protein dieser Synthesemaschinerie stellt also das Carrier Protein (CP) dar, das die wachsende Fettsäurekette während der Synthese von einem katalytischen Zentrum zum anderen transportiert. Die 4'-PP-Gruppe wird durch eine 4'-Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase) posttranslational auf einen konservierten Serinrest des *apo*-CP übertragen. Erst durch diesen Vorgang wird das CP in seine aktive *holo*-Form überführt. Auf die durch die PPTasen katalysierte Reaktion wird in Kapitel 2.2.2 näher eingegangen.

2.1.2 Die Polyketidsynthese

Die Polyketidsynthasen (PKS) lassen sich in vielerlei Hinsicht mit den FAS vergleichen (16,17). Zur Synthese eines Polyketids sind drei Domänen erforderlich, die auf großen Polypeptidketten in Modulen organisiert sein können. Die Acyltransferase-(AT)-Domäne übernimmt die Selektion des Substrates. Substrate sind, wie auch bei der Fettsäuresynthese, Malonyl-CoA, jedoch, im Unterschied zur FAS in Bakterien auch Methyl-, Ethyl- oder Propylmalonyl-CoA (18). Die AT-Domäne überträgt das Substrat (z.B. Propionyl-CoA) auf den 4'PP des zugehörigen *holo*-ACP, die dem ACP der FAS analoge Transporteinheit (Abb. 2 A). Anschließend wird es weiter auf einen Cys-Rest im aktiven Zentrum der Ketosynthase-(KS)-Domäne übertragen (Abb. 2 B) (18). Das im folgenden Modul ACP-gebundene Malonylderivat (z.B. Methylmalonyl-CoA) wird decarboxyliert, was ein freies Nukleophil für die nun folgende Claisen-Kondensation mit dem KS-gebundenen Ketid liefert (Abb. 2 B). Demnach wird das Kettenstartsubstrat (hier: Propionyl-CoA) immer auf das Kettenverlängerungssubstrat (hier: Methylmalonyl-CoA) übertragen (Abb. 2 C), bis das Produkt nach Abschluss aller Elongationsschritte unter Makrozyklisierung von einer Te-Domäne abgespalten wird, wodurch die Synthase für weitere Syntheserunden regeneriert wird. Auch bei PKS gibt es weitere optionale Domänen. Diese sind, wie bei FAS eine KR-, DH- sowie ER-Domäne. Das Vorhandensein oder

Fehlen dieser optionalen Domänen entscheidet darüber, ob die Synthese auf Stufe der Hydroxylgruppe oder der Doppelbindung angehalten wird, oder ob eine vollständige Reduktion erfolgt (18).

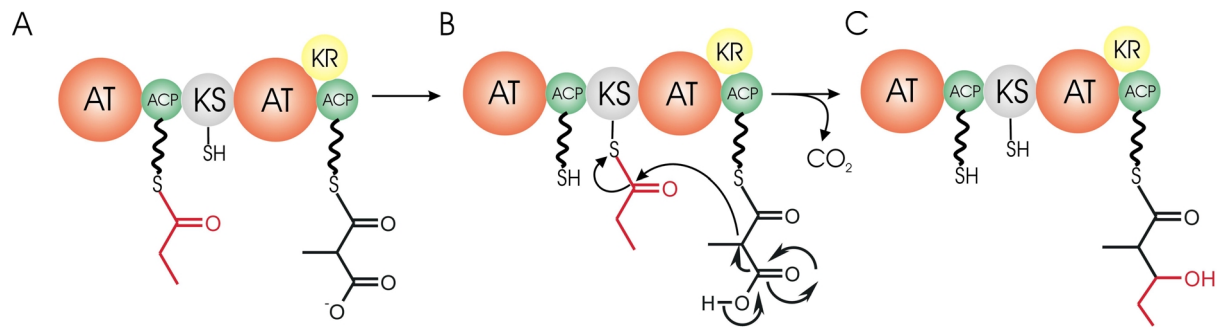


Abb. 2: Polyketidsynthese am Beispiel eines fiktiven PKS Templates. **A.** Zunächst belädt die AT-Domäne das erste ACP mit Propionyl und die zweite AT-Domäne ihr kognates ACP mit Methylmalonyl. **B.** Der Propionylrest wird auf ein Cystein im aktiven Zentrum der KS-Domäne übertragen. Anschließend wird das ACP-gebundene Methylmalonyl decarboxyliert, um das Nukleophil für die Claisen-Kondensation mit dem Propionyl zu liefern. **C.** Das Produkt der Kondensation ist nun konvalent auf dem 4'PP des zweiten ACP gebunden und steht für weitere Kettenverlängerungen zur Verfügung. Die KR-Domäne hat das β-Carbonyl zur Hydroxyfunktion reduziert. Abkürzungen: AT: Acyltransferase, ACP: Acyl Carrier Protein, KS: Ketosynthase, KR: Ketoreduktase.

2.1.3 Die Nichtribosomale Peptidsynthese

Die Verwendung eines CPs zum Transport von Syntheseintermediaten ist nicht auf die FAS und PKS beschränkt. Eine Vielzahl von bioaktiven Substanzen werden von sog. nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) in Bakterien und Pilzen hergestellt (19-21). Zu diesen Substanzen zählen neben antibiotischen Agenzien auch Immunsuppressiva und Cytostatika, die vielfach Einzug in die moderne Medizin gefunden haben (Abb. 3). Auf diesem Weg werden z. B. das Heptapeptidantibiotikum Vancomycin (22) und das zyklische Lipopeptid Surfactin (23) hergestellt. Neben solchen Stoffen werden auch sog. Siderophore (Abb. 3) nichtribosomal produziert. Sie dienen den Bakterien unter Eisenmangelbedingungen zur Komplexierung von Eisenionen der Umgebung. Der Eisen-Siderophor Komplex wird anschließend aktiv in die Zelle zurücktransportiert (24-28).

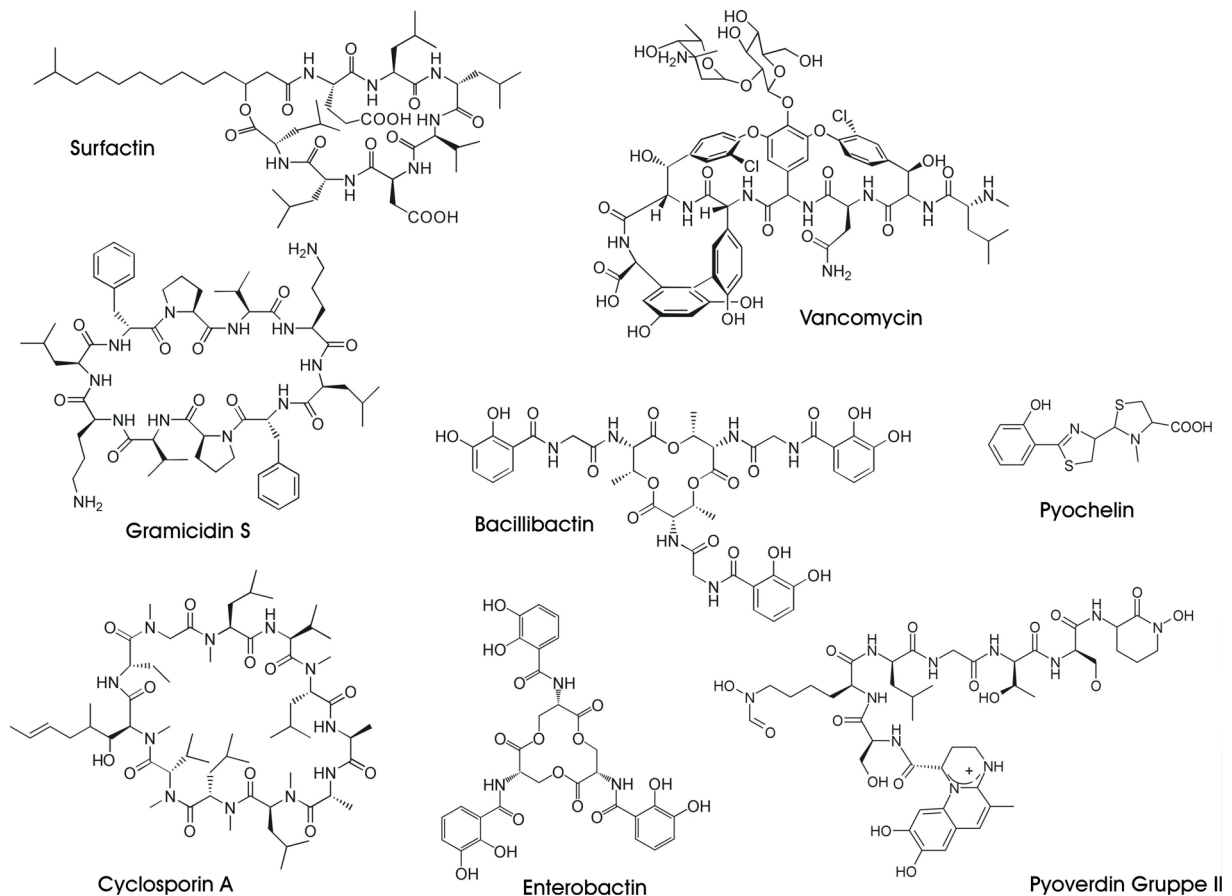


Abb. 3: Strukturen einiger nichtribosomal produzierter Peptide. Gezeigt sind die Antibiotika Surfactin, Vancomycin und Gramicidin S, das Zytostatikum Cyclosporin A sowie die Siderophore Bacillibactin, Pyochelin, Enterobactin und Pyoverdin der Gruppe II.

Die Vielzahl der inzwischen bekannten, nichtribosomal produzierten Peptide zeigt neben der strukturellen Vielfalt eine Loslösung von den Restriktionen der ribosomalen Proteinbiosynthese. Zum einen zeigen die Strukturen einen zumeist makrozyklischen oder verzweigt makrozyklischen Aufbau, zum anderen finden auch nicht-proteinogene Aminosäuren (AS) Verwendung. Außerdem findet man auch *N*-methylierte, *N*-formylierte und glycosylierte AS (29). Diese Modifikationen werden von sog. optionalen Domänen und z.T. postsynthetisch eingebracht. Aufgrund ihrer komplexen Struktur sind diese Substanzen auf chemischem Wege nicht leicht darzustellen, was ein Verständnis ihrer Synthese und eine Manipulation der biochemischen Maschinerie zur Erzeugung neuer Produkte besonders interessant macht.

2.1.3.1 Aufbau von NRPS und Peptidsynthese am Proteintemplat

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind große multifunktionale Proteine mit modularem Aufbau (30,31). In diesem Zusammenhang wird ein Modul als die Einheit bezeichnet, die für die Inkorporation einer AS in das finale Produkt verantwortlich ist (Abb. 4). Module bestehen wiederum aus Domänen, welche die einzelnen enzymatischen Schritte der nichtribosomalen Peptidsynthese katalysieren (Abb. 4). Auf Proteinebene lassen sich die einzelnen Domänen anhand charakteristischer, hochkonservierter Sequenzmotive, den sog. „Core-Motiven“ identifizieren (19,21).

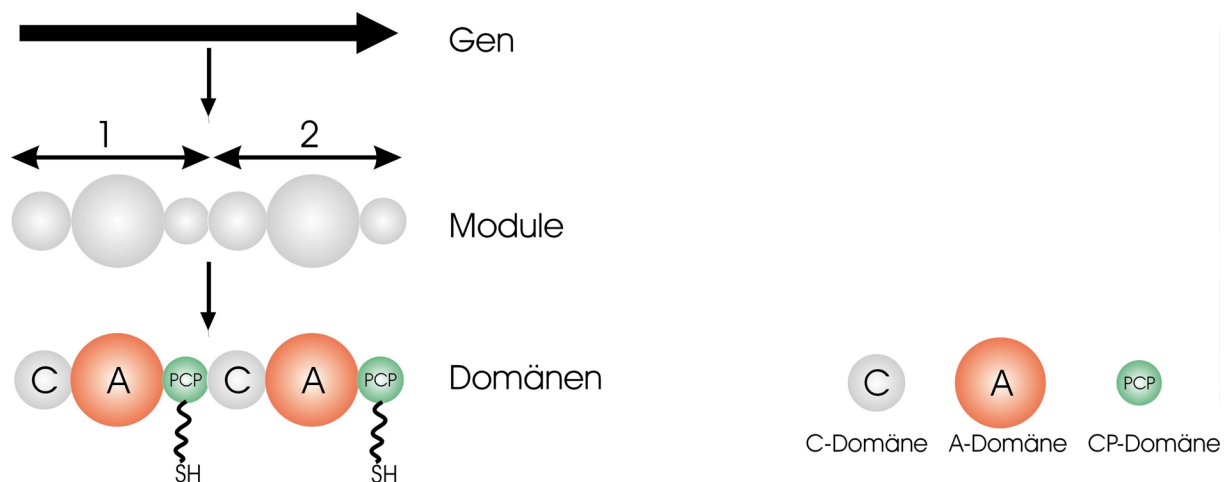


Abb. 4: NRPS-Gene kodieren für große Enzyme, die einen modularen Aufbau besitzen. Ihre Module lassen sich weiter unterteilen in einzelne Domänen, deren enzymatische Aktivität für die Peptidsynthese notwendig ist. A-Domänen katalysieren die spezifische Erkennung und Aktivierung des AS-Substrats, das anschließend kovalent mit dem 4'PP der CP-Domäne verknüpft wird. Die C-Domäne katalysiert schließlich die Peptidbindungsknüpfung zwischen AS benachbarter Module. Abkürzungen: C-Domäne: Kondensationsdomäne, A-Domäne: Adenylierungsdomäne, CP-Domäne: Carrier Protein Domäne.

Zur Synthese des Peptidrückgrats sind mindestens drei Domänen, für die Substraterkennung und -aktivierung, für den Transport zum jeweiligen katalytischen Zentrum, sowie für die Peptidbindungsknüpfung, erforderlich. Bei diesen Domänen handelt es sich um die Adenylierungs-(A)-Domäne (21,32-34), eine CP-Domäne, also das Peptidyl Carrier Protein (PCP) (35,36) sowie die Kondensations-(C)-Domäne (37-39) (Abb. 4).

Die Synthese entlang des Proteintemplats erfolgt gerichtet (40,41). Nach einer Modellvorstellung wird das 4'PP des PCP zunächst von der A-Domäne mit der entsprechenden AS beladen (Abb. 5 A), da in diesem Zustand die Affinität des nicht beladenen HS-4'PP zur A-Domäne am Höchsten ist. Das so entstandene Aminoacyl 2-S-4'PP bleibt dann so lange in der Akzeptorposition der C-Domäne, bis die Peptidbindung mit dem Aminoacyl (oder Peptidyl) 1-S-4'PP des stromaufwärts gelegenen Moduls, das sich jetzt in der Donorposition befindet, geknüpft wurde (Abb. 5 B). Anschließend ist nach dem Modell die Affinität des Peptidyl-S-4'PP zur

Donorposition der C-Domäne des folgenden Moduls maximal (Abb. 5 C) und die Synthese kann gerichtet weiter erfolgen. Auf diese Weise wird verhindert, dass das Aminoacyl 2-S-4'PP fälschlicherweise zur Akzeptorposition der C-Domäne des folgenden Moduls transferiert wird.

Die nichtribosomale Peptidsynthese erfolgt nach dem sog. „multiple carrier thiotemplate model“ (42). Dieses Modell unterscheidet zwischen Elongationsmodulen mit der Domänenorganisation C-A-PCP, und sog. Initiationsmodule, die im Unterschied dazu keine C-Domäne enthalten und daher nur dazu dienen die Synthese durch Substrataktivierung und –bindung zu starten (Abb. 5) (31).

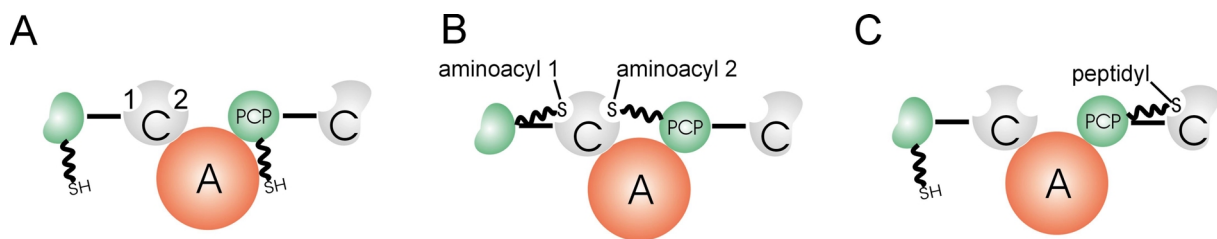


Abb. 5: Modell der Peptidsynthese am NRPS Templat. Während der Synthese differiert die Affinität des 4'PP zu den verschiedenen NRPS Domänen je nach seinem Beladungszustand. **A.** Unbeladen ist die Affinität zur A-Domäne des entsprechenden Moduls am Höchsten. **B.** Nach der Beladung mit einer AS hat der Aminoacyl 2-4'PP maximale Affinität zur Akzeptorposition (2) der C-Domäne, das zweite Substrat der C-Domäne ist in diesem Fall das Aminoacyl 1-S-4'PP des stromaufwärts gelegenen Moduls, das sich jetzt in der Donorposition (1) befindet. **C.** Nach der Peptidbindungsknüpfung ist schließlich die Affinität des Peptidyl-4'PP zur Donorposition (1) der C-Domäne des folgenden Moduls maximal.

In vielen Fällen erfolgt die Synthese kolinear zum Proteintemplat, d.h. die Anzahl der einzubauenden AS entspricht der Anzahl der vorhandenen Module (33). Nachdem die wachsende Peptidkette alle Module durchlaufen hat, befindet sie sich schließlich auf dem PCP des letzten Moduls. Dort wird sie, häufig katalysiert durch eine Thioesterase-(Te)-Domäne, abgespalten und zyklisiert, so dass die Synthetase anschließend für eine weitere Syntheserunde zur Verfügung steht (43,44).

Zur Inkorporation von D-AS wird entweder eine D-AS-spezifische A-Domäne (45) oder aber eine sog. Epimerisierungs-(E)-Domäne gebraucht. Die E-Domänen sind C-terminale Nachbarn des PCP eines Moduls und katalysieren die Epimerisierung der PCP-gebundenen Substrataminosäure oder der C-terminalen AS des wachsenden Polypeptids (46,47). Da schließlich eine D-AS in das Produkt eingebaut wird, selektiert die C-Domäne des stromabwärts gelegenen Moduls das entsprechende D-Enantiomer, wenn die E-Domäne eine Aminoacyl-Epimerase ist bzw. Diastereomer, wenn es sich um eine Peptidyl-Epimerase handelt (41,46,48). Außerdem kann die C-Domäne zur Inkorporation von Heterozyklen durch eine Zyklisierungs-(Cy)-Domäne ersetzt werden (49,50). Neben diesen können noch weitere, optionale Domänen vorhanden sein, die hier nicht näher besprochen werden sollen (51-54).

2.1.4 Weitere CP-abhängige Stoffwechselwege

Neben den oben genannten, wichtigsten Beispielen von Biosynthesewegen, die sich eines CP bedienen, um Intermediate der Synthese von einem katalytischem Zentrum zu anderen zu transportieren, sind inzwischen weitere solcher Synthesewege bekannt. In *S. cerevisiae* z. B. erfordert die Biosynthese von Lysin das bifunktionale Enzym Lys2 (55,56). Lys2 beinhaltet ein spezielles PCP, dessen *holo*-Form das aktivierte α -Aminoadipat bindet. Dies wird dann durch die zweite Domäne von Lys2, die Reduktase, in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu α -Aminoadipat Semialdehyd (AAS) reduziert (56). Im Gegensatz dazu ist Lysin in höheren Eukaryonten essentiell, wird jedoch durch Umkehr des Hefesyntthesewegs zu α -Aminoadipat abgebaut. Dazu ist unter anderem die AAS Dehydrogenase U26 notwendig (57). Dieses multifunktionale Enzym besitzt eine A-Domäne, eine CP-Domäne, sowie sieben Bindemotive für den Redoxfaktor Pyrrolquinolin Quinon (PQQ). Ebony aus *Drosophila melanogaster* katalysiert ebenfalls Reaktionen, die für NRPS typisch sind (58). Ebony beinhaltet eine aktivierende Domäne, die β -Alanin als Acyladenylat ähnlich einer A-Domäne aktiviert und auf den Cofaktor eines CPs überträgt. Eine carboxyterminale Domäne scheint für die Selektion eines biogenen Amins zuständig zu sein, das anschließend, ohne die Zuhilfenahme einer C-Domäne, kovalent in einer Peptidbindung mit dem aktivierten β -Alanin verknüpft wird. Obwohl die Rolle von Ebony noch nicht völlig geklärt ist, wird angenommen, dass es im Neurotransmitter Metabolismus involviert ist. Da Ebony neben Dopamin, Serotonin, Octopamin und Tyramin auch Histamin kovalent mit β -Alanin verknüpfen kann, wird ihm eine Rolle in der Beseitigung von Histamin aus dem synaptischen Spalt des Photorezeptors des Auges zugeschrieben.

Einige Pflanzenarten, wie z. B. die Leguminosen, bilden Symbiosen mit Bodenbakterien der Gattung *Rhizobium* (59). Unter Stickstoffmangelbedingungen bilden die Pflanzen Wurzelknoten aus, die das Bakterium dann intrazellulär beherbergen. Dort wandeln die Bakterien Luftstickstoff in Ammoniak um. Für die Infektion der Pflanzenzelle sind die sog. Nod-Faktoren essentiell, die induziert durch z.B. Wirtsflavonoide, produziert werden. Sie bestehen aus einem 4-5 Einheiten langen, β -1,4 verknüpften, *N*-Acetyl-D-Glucosamin Rückgrat, dessen nicht-reduzierendes Ende an C₂ mit einer Fettsäure modifiziert ist. Diese Fettsäure ist die Determinante für die Interaktion der *Rhizobien* mit dem Wirt (59). Während eine ganze Reihe von verschiedenen Proteinen in die Synthese der Nod-Faktoren involviert ist, sind NodE und NodF besonders wichtig für die Infektion der Pflanze (60). NodF ist ein Homolog des FAS ACP während NodE das Äquivalent der *E. coli* 3-Oxoacyl Synthase ist (61). Beide Proteine sind ausreichend, um die ungewöhnliche, α,β -ungesättigte Fettsäure zu produzieren, die von der Acyltransferase NodA schließlich auf das Oligosaccharidrückgrat übertragen wird.

2.2 Zentrale Rolle von CP und PPTasen

2.2.1 Die CP Superfamilie

Das CP ist die wichtigste Schnittstelle zwischen verschiedenen Interaktionspartnern. Da es CP in den verschiedensten, o.g. Systemen gibt, haben sie sehr unterschiedliche Aufgaben, die jedem CP seinen Namen gaben. Die ACP transportieren Acetat, Propionat oder Malonateinheiten, während PCP AS- oder Peptidyl-Einheiten von einem katalytischen Zentrum zum anderen weiterreichen. Eine noch nicht erwähnte Untergruppe ist das Aryl Carrier Protein (ArCP), das zum Transport von Arylgruppen, z.B. zur Siderophorsynthese benötigt wird (25). Trotz ihrer unterschiedlichen Aufgaben hat sich jedoch gezeigt, dass die Strukturen der CP sehr ähnlich sind. Es handelt sich, wie in Abb. 6 am Beispiel des *B. subtilis* FAS ACP (62) sowie des TycC3PCP (35), um ein Vierhelix-Bündel. Neben den Strukturen ist der wichtigste Unterschied zwischen den CP anhand der Oberflächenpotentiale zu sehen. ACP sind vorwiegend saure Proteine, wohingegen PCP eher neutral sind.

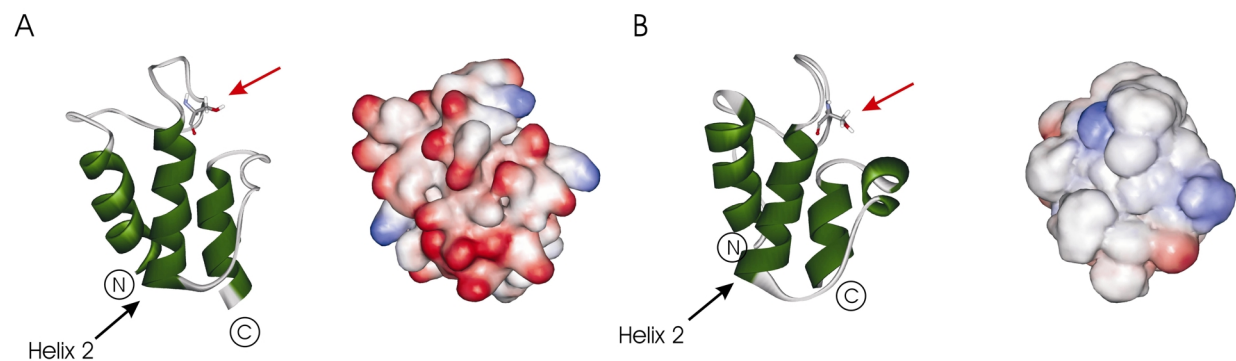


Abb. 6: Strukturen zweier CP-Vertreter. A. Struktur des *B. subtilis* FAS ACP. N- sowie C-Terminus des Proteins sind zusätzlich zu dem mit rotem Pfeil markierten Serinrest (4'PP-Bindestelle) sowie Helix 2 gekennzeichnet. Rechts daneben ist das elektrostatische Oberflächenpotential in gleicher Orientierung gezeigt. B. Struktur des TycC3-PCP, Kennzeichnung wie A. Farbcode der Oberflächenpotentiale: rot: negativ, weiß: neutral, blau: positiv.

Zwei Studien haben gezeigt, dass PCP je nach Lokalisierung innerhalb des Domänenverbandes deutliche Unterschiede zeigen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass PCP in Sequenzvergleichsuntersuchungen entsprechende Gruppen ausbilden, je nach ihrem Domänen-Interaktionspartner, bzw. sogar je nachdem, welche AS sie akzeptieren (63). Linne *et al.* konnten anschließend zeigen, dass PCP, die N-terminal zu C-Domänen gelegen sind (PCP^C) nicht mit E-Domänen interagieren (46). Ein Alignment wie in Abb. 7 konnte zeigen, dass die Unterschiede zu den PCP, die N-terminal von E-Domänen liegen (PCP^E) vornehmlich im Core-Motiv (LGG(DH)S(L/I)) und in Helix 2 des CP zu finden sind (46,64). Die wichtigsten Unterschiede sind das Core-Motiv GGDSI in PCP^E verglichen mit GGHSI für PCP^C. Außerdem enthalten PCP^E einen hochkonservierten Gln-Rest an Position 50

(Nummerierung nach der TycC3-PCP Struktur (35)) und eine AS-Deletion an Position 58 (Abb. 7). Auch sind die Pro- und Glu-Reste an Positionen 64 und 70 nicht konserviert und Position 67 ist mit den sauren AS Asp oder Glu besetzt, gegenüber einem hydrophoben Rest in PCP^C.

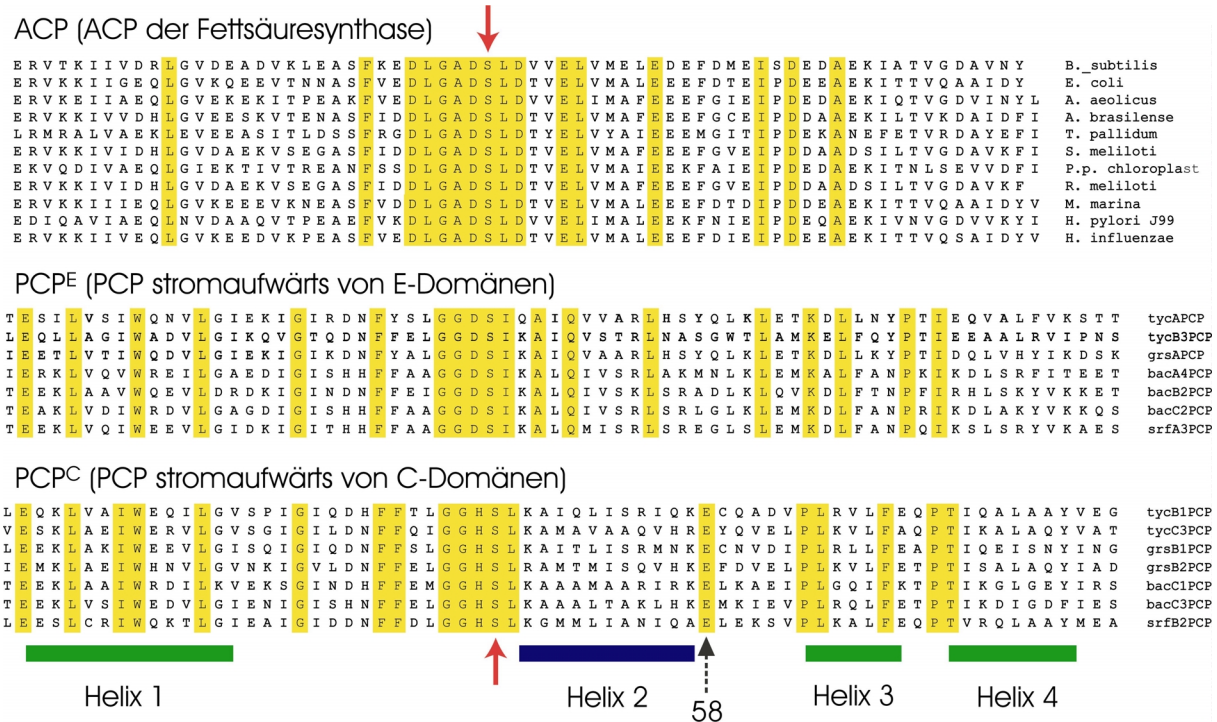


Abb. 7: Sequenzalignment der ACP und verschiedener PCP. Hochkonservierte Reste sind gelb unterlegt. Boxen unterhalb des Alignments zeigen die Position der jeweiligen AS in der Struktur der CP (nach [Weber, 2000 #25]). Der rote Pfeil markiert den invarianten Serinrest, dessen Hydroxygruppe mit dem 4'PP modifiziert wird. Die meisten Unterschiede zwischen den PCP befinden sich im Bereich des Core-Motivs (LGG(DH)S(L/I)) und in Helix 2 und 3. Der gestrichelte Pfeil markiert den konservierten Rest an Position 58 von PCP^C, der in PCP^E fehlt.

Neben den hier gezeigten PCP existiert noch eine dritte Gruppe. Es handelt sich um solche PCP, die stromaufwärts von Te-Domänen liegen. Sie bilden jedoch keine eigene Gruppe, da sie den PCP^C sehr ähneln.

2.2.2 Phosphopantetheinyl Transferasen

Die CP der oben genannten Systeme müssen posttranslational modifiziert werden, um ihre Funktion als Transportproteine ausführen zu können (Abb. 8). Dazu wird der 4'PP-Rest von CoA auf einen konservierten Serinrest des CP übertragen. Die Übertragung des 4'PP-Rests erfolgt katalysiert durch sog. 4'-Phosphopantetheinyl Transferasen (PPTasen) in einer Mg²⁺-abhängigen Reaktion (65,66). Auf diese Weise können die Syntheseintermediate statt als Ester, als energiereiche Thioester am sog. 4'PP gebunden werden, was die Hydrolyse erleichtert.

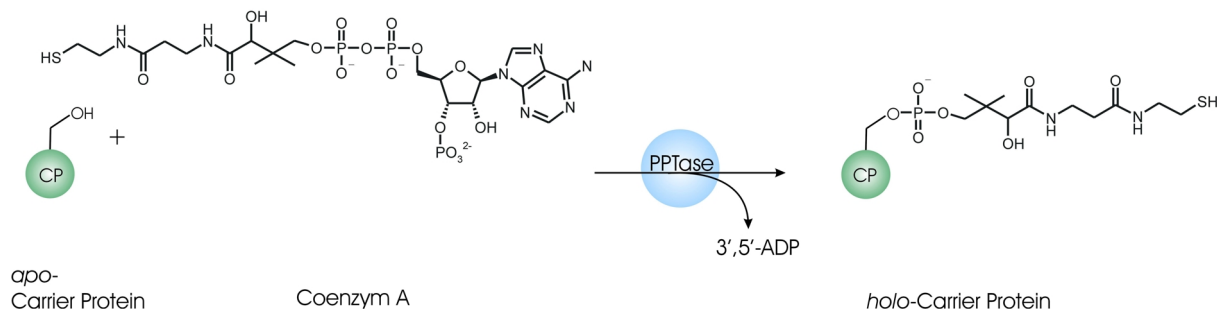


Abb. 8: 4'-PP Transfer katalysiert durch PPTasen. Die PPTase katalysiert den nukleophilen Angriff des invarianten Serinrests des *apo*-CP auf das β -Phosphat von Coenzym A. Es resultiert das 4'PP modifizierte *holo*-CP, während 3',5'-ADP abgespalten wird.

Die Bedeutung der PPTasen konnte besonders eindrucksvoll am Beispiel von *B. subtilis* JH642 gezeigt werden. Dieser Stamm besitzt zwar eine intakte Surfactin Synthetase, jedoch eine dysfunktionale PPTase, sodass die CP der Synthetase in der inaktiven *apo*-Form verbleiben. Komplementation mit einer intakten PPTasen führte zur Aktivierung der CP und zur Produktion von Surfactin (67,68). Ebenso konnte *B. subtilis* MR168 nach Transformation mit chromosomaler DNA des Plipastatinproduzenten *B. subtilis* YB8 das Lipopeptidantibiotikum Plipastatin produzieren. Hier wurde ebenfalls festgestellt, dass neben dem *pps* Operon auch die PPTase Lpa-8 (Sfp) essentiell war (69). Aufgrund ihrer Größe und Substratspezifität sind PPTasen in drei verschiedene Klassen eingeteilt worden (Abb. 9) (65). Der namensgebende Vertreter der ersten Klasse ist *E. coli* AcpS (70-73). PPTasen dieser Klasse haben eine Größe von etwa 120 kDa und eine eingeschränkte Substrattoleranz. Viele Organismen enthalten eine PPTase dieses Typs zur Modifikation des FAS ACP. Andere CP werden von diesen Enzymen jedoch, mit wenigen Ausnahmen, nicht modifiziert. Zu diesen Ausnahmen zählen z. B. PKS ACP verschiedener *Streptomyces* spp. (74), sowie DltC (DCP) aus *Lactobacillus* (75). Eine Besonderheit stellt die *S. cerevisiae* PPTase2 dar, da sie lediglich für die Modifikation des mitochondrialen ACP zuständig zu sein scheint (76). *E. coli* AcpS ist als erste PPTase dieses Typs eingehend charakterisiert worden. Außerdem konnte die essentielle Bedeutung von AcpS für *E. coli* festgestellt werden (77). Die erste Kristallstruktur einer PPTase dieses Typs ist jedoch von *B. subtilis* AcpS gelöst worden (78). Parris *et al.* konnten zeigen, dass aktives AcpS ein homotrimeres Arrangement zeigt, sowohl im Kristall, als auch in Lösung. Dies konnte auch für andere AcpS-Typ PPTasen bestätigt werden (79,80).

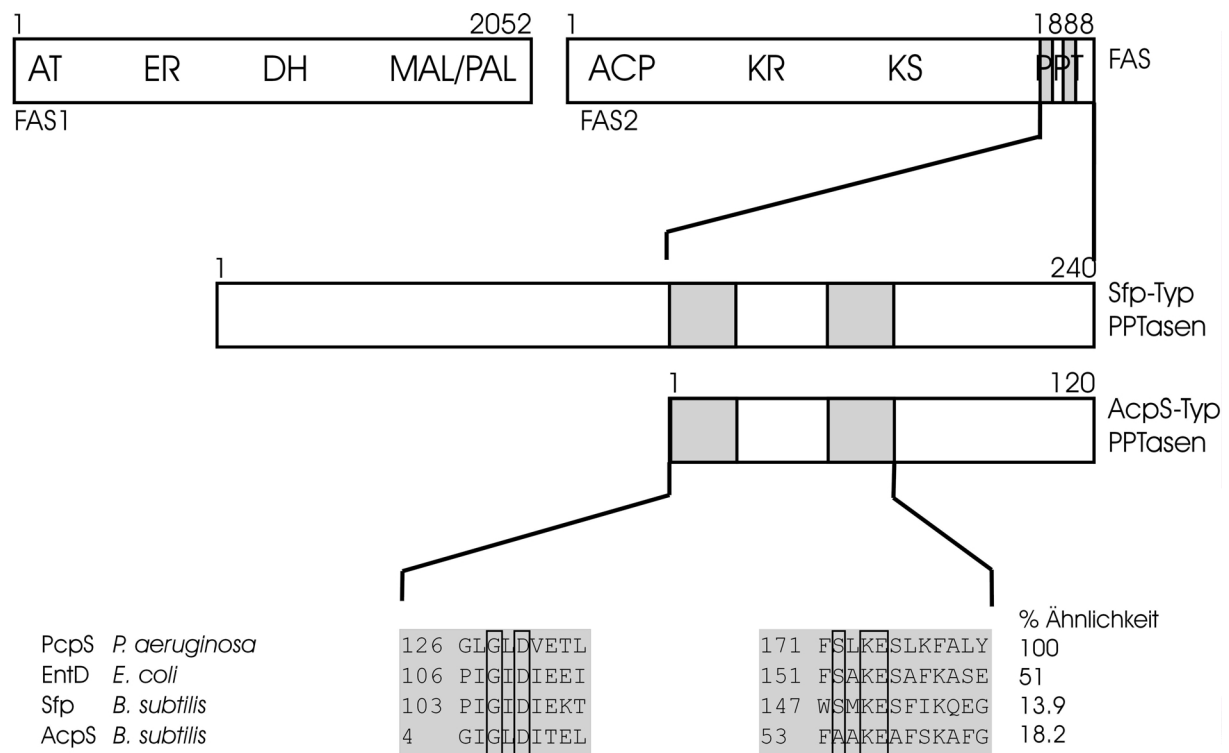


Abb. 9: Partielles Sequenzalignment der Sfp-Typ PPTasen Pc pS, EntD, Sfp und der AcpS-Typ PPTase AcpS. Die oberen Boxen zeigen *S. cerevisiae* FAS 1 und 2 (nicht maßstabsgetreu) mit ihren katalytischen Domänen (Abkürzungen: AT: Acetyltransferase, ER: Enoylreduktase, DH: Dehydratase, MAL/PAL: Malonyl-/Palmitoyltransferase, KR: Ketoreduktase, KS: β -Ketoacylsynthase, PPT: PPTase). Die Größe ist über den Boxen in AS angegeben. Die Boxen unter FAS repräsentieren Sfp-Typ bzw. AcpS-Typ PPTasen; die Zahlen über den Boxen geben die ungefähre Größe in AS an. Hochkonservierte Regionen nach [Lambalot, 1996 #2312] sind grau unterlegt. Im Sequenzalignment sind hochkonservierte Reste durch Boxen hervorgehoben. Die % Ähnlichkeit bezieht sich auf die *P. aeruginosa* PPTase Pc pS.

Als erste PPTase des zweiten, Sfp-Typs, konnte *B. subtilis* Sfp charakterisiert und kristallisiert werden (81,82). Diese Klasse von PPTasen kennzeichnet ein pseudohomodimerer Aufbau, sowie eine Größe von etwa 240 AS (Abb. 9). Besonders für den am Besten charakterisierten Vertreter, Sfp aus *B. subtilis*, konnte bisher kein CP gefunden werden, das nicht als Substrat akzeptiert wird (83),(23), da das Enzym über eine flexible Schleife für die Erkennung der CP verfügt, wodurch eine gute Anpassungsfähigkeit erreicht wird. Weiter Vertreter der Sfp-Typ PPTasen sind z. B. die PPTasen Gsp (*B. brevis*) (84), Bli (*B. licheniformis*) (85), sowie EntD (*E. coli*) (70), VibD (*V. cholerae*) (86) und MtaA (*S. aurantiaca*) (87). Die PPTasen höherer Organismen sind inzwischen ebenfalls bekannt und charakterisiert worden. So besitzen *S. cerevisiae*, *A. nidulans* und der Mensch ebenfalls PPTasen des Sfp-Typs mit breiter Substrattoleranz. In *S. cerevisiae* ist Lys5 verantwortlich für die Modifikation von Lys2 (s.o.) (55,56). *A. nidulans* benötigt seine Sfp-Typ PPTase CfwA2/NpgA zur posttranslationalen Modifikation von CP verschiedener Stoffwechselwege, unter anderem der PCP, die in der Penicillinbiosynthese involviert sind (88). Erst kürzlich wurde die PPTase des Menschen, die ebenfalls vom Sfp-Typ ist, identifiziert und charakterisiert. Unter anderem konnte sie Lys5 in

Hefe komplementieren und zeigte eine breite Substrattoleranz auch gegenüber prokaryontischen CP (89,90).

Die dritte Klasse von PPTasen beinhaltet solche, die als integrale Bestandteile der eukaryontischen FAS gefunden werden. Dazu zählt z. B. die Hefe PPTase der FAS2 (15,91). Diese Enzyme sind vermutlich monomeren Typs und, da sie Teil einer größeren Polypeptidkette sind, in der Lage Selbstphosphorylierung zu betreiben (Abb. 9).

2.2.3 Katalyse und Vorkommen der AcpS- und Sfp-Typ PPTasen

Nach Bekanntwerden der Strukturen von Sfp (81) sowie AcpS (78) wurde schnell klar, dass die beiden Enzyme die Phosphopantetheinylierungsreaktion auf sehr unterschiedliche Weise katalysieren. Die Kristallstruktur von AcpS zeigte überraschenderweise ein Trimer, obwohl man aufgrund der pseudohomodimeren Struktur von Sfp lange angenommen hatte, dass AcpS als Homodimer aktiv sei (70). Abb. 10 zeigt beide Strukturen. Da AcpS mit seinem Proteinsubstrat ACP kristallisiert wurde, war dessen Bindestelle bekannt. Sfp hingegen wurde ohne sein kognates PCP kristallisiert. Seine CP Bindestelle konnte erst durch aufwändige Mutationsanalyse offengelegt werden (83). Aufgrund der strukturellen Unterschiede besitzt AcpS drei katalytische Taschen, Sfp hingegen nur eine (Abb. 10). Daher war es auch vorstellbar, dass AcpS unter allosterischer Kontrolle steht (70). Charakterisierung von *B. subtilis* AcpS sowie *S. pneumoniae* AcpS haben auf einen solchen Mechanismus hingewiesen (80,92), da für ACP zwei Michaelis-Konstanten bei niedrigen und hohen Substratkonzentrationen bestimmt werden konnten.

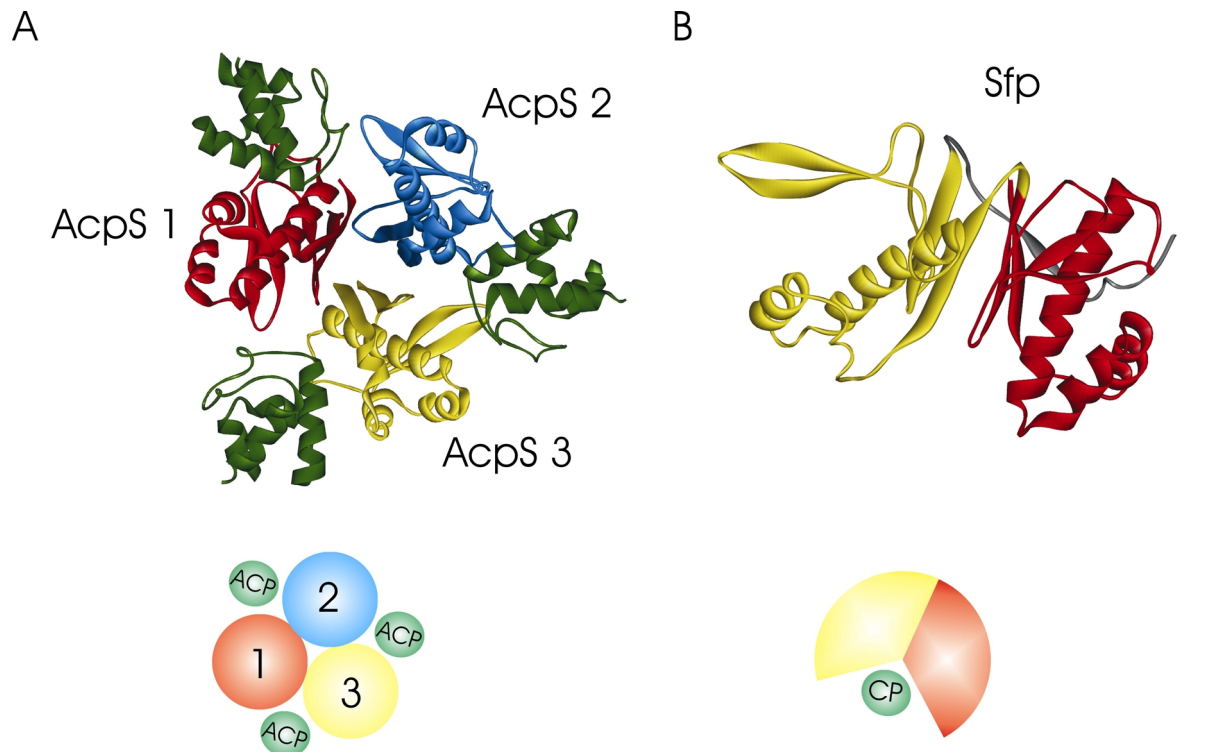


Abb. 10: Kristallstrukturen von *B. subtilis* AcpS und Sfp. A. Kristallstruktur des *B. subtilis* AcpS-ACP Komplexes. Die einzelnen Monomere sind in rot, blau und gelb hervorgehoben, ACP ist grün. Darunter ist symbolisch das Arrangement der AcpS-Monomere sowie ACP in gleicher Farbcodierung gezeigt. B. Struktur des pseudohomodimere Sfp. Die beiden Sfp-Hälften sind in gelb bzw. rot eingefärbt. Unter der Struktur sind symbolisch die beiden Sfp-Hälften in den gleichen Farben gezeigt. Außerdem gezeigt ist die putative CP Bindestelle.

Viele Organismen, die verschiedene 4'PP-abhängige Stoffwechselwege beschreiten besitzen auch mehrere PPTasen (Tab. 1). *E. coli*, z.B., besitzt drei PPTasen, nämlich AcpS, die Sfp-Typ PPTase EntD und YhhU (zuvor o195). Diese PPTasen besitzen reziproke Spezifitäten. Während AcpS lediglich für die Modifikation des FAS ACP zuständig ist (71,72), erkennt EntD (70) nur die CP der Enterobactinsynthetase, die der Produktion des Siderophors Enterobactin dient (93). Die Rolle von YhhU ist bis heute nicht geklärt und sein Proteinpartner nicht bekannt, es kann jedoch AcpS komplementieren, wenn es in *E. coli* überproduziert wird (65,70). *B. subtilis* produziert sowohl Fettsäuren, als auch das zyklische Lipopeptid Surfactin mittels CP-abhängiger Stoffwechselwege (23,67). Wegen der hohen Substrattoleranz des Sfp (23,83) blieb jedoch die Frage offen, ob AcpS für *B. subtilis* ebenso essentiell ist wie für *E. coli*. Mootz *et al.* konnten zeigen, dass der Phänotyp einer *B. subtilis* AcpS-Deletionsmutante vom Wildtyp nicht zu unterscheiden war (94), daher ist es vorstellbar, dass AcpS in Organismen, die eine zweite, Sfp-Typ PPTase, mit breiter Substrattoleranz besitzen, verloren gehen kann. Wie in Tab. 1, die z.T. mit dem Programm BLAST (95,96) erstellt wurde, rot hervorgehoben, gibt es Organismen, die lediglich eine einzige, Sfp-Typ PPTase besitzen.

Tabelle 1: Vorkommen von AcpS- und Sfp-Typ PPTasen in ausgewählten Bakterienstämmen

	AcpS-Typ PPTase	Sfp-Typ PPTase		AcpS-Typ PPTase	Sfp-Typ PPTase
<i>A. acolicus</i>	+	-	<i>M. tuberculosis</i>	+	+
<i>B. burgdorferi</i>	+	-	<i>N. meningitidis</i>	+	-
<i>B. halodurans</i>	+	+	<i>Nostoc sp.</i> <i>PCC6803</i>	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>	-	+
<i>C. acetobutylicum</i>	+	+	<i>S. aureus</i>	+	+
<i>C. perfringens</i>	+	+	<i>S. coelicolor</i>	+	+
<i>C. pneumoniae</i>	+	-	<i>S. enterica</i>	+	+
<i>C. trachomatis</i>	+	-	<i>S. pneumoniae</i>	+	-
<i>D. radiodurans</i>	+	-	<i>S. spirochete</i>	+	-
<i>E. coli</i>	+	+	<i>S. typhimurium</i>	+	+
<i>H. influenzae Rd</i>	-	+	<i>Synochocystis</i> <i>PCC6803</i>	-	+
<i>H. pylori</i>	+	-	<i>Th. maritima</i>	+	-
<i>M. genitalium</i>	+	-	<i>V. cholerae</i>	+	+
<i>M. leprae</i>	+	-	<i>Y. pestis</i>	+	+

2.2.4 Toleranz der PPTase gegenüber CoA-Derivaten

In der Bakterienzelle liegt CoA in der Hauptsache in Form von Acyl-CoA und nicht unmodifiziert vor. Untersuchungen mit *E. coli* AcpS (74) und *B. subtilis* Sfp (23) haben gezeigt, dass diese Enzyme auch CoA-Derivate als Substrat akzeptieren, obwohl angenommen wird, dass CoA das natürliche Substrat der PPTasen ist (Abb. 11). Beide Enzyme konnten *in vitro* ACP sowohl mit Desulfo-, Homocysteamin- als auch mit Acetonyldethio-CoA modifizieren (23,74). Sfp wurde zusätzlich mit Benzoyl-, Phenylacetyl-, Acetyl- und 3'-Dephospho-CoA getestet und es kam auch PCP als Proteinsubstrat zum Einsatz (23). In allen Fällen bis auf 3'-Dephospho-CoA konnte der Transfer auf ACP massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Dies impliziert eine breite Substrattoleranz hinsichtlich Derivatisierung von CoA jenseits des 4'PP. Das 3'-Dephospho-CoA kein Substrat darstellte ist angesichts der Kristallstrukturen (78,81) nicht verwunderlich, da diese Phosphatgruppe von den PPTasen koordiniert wird.

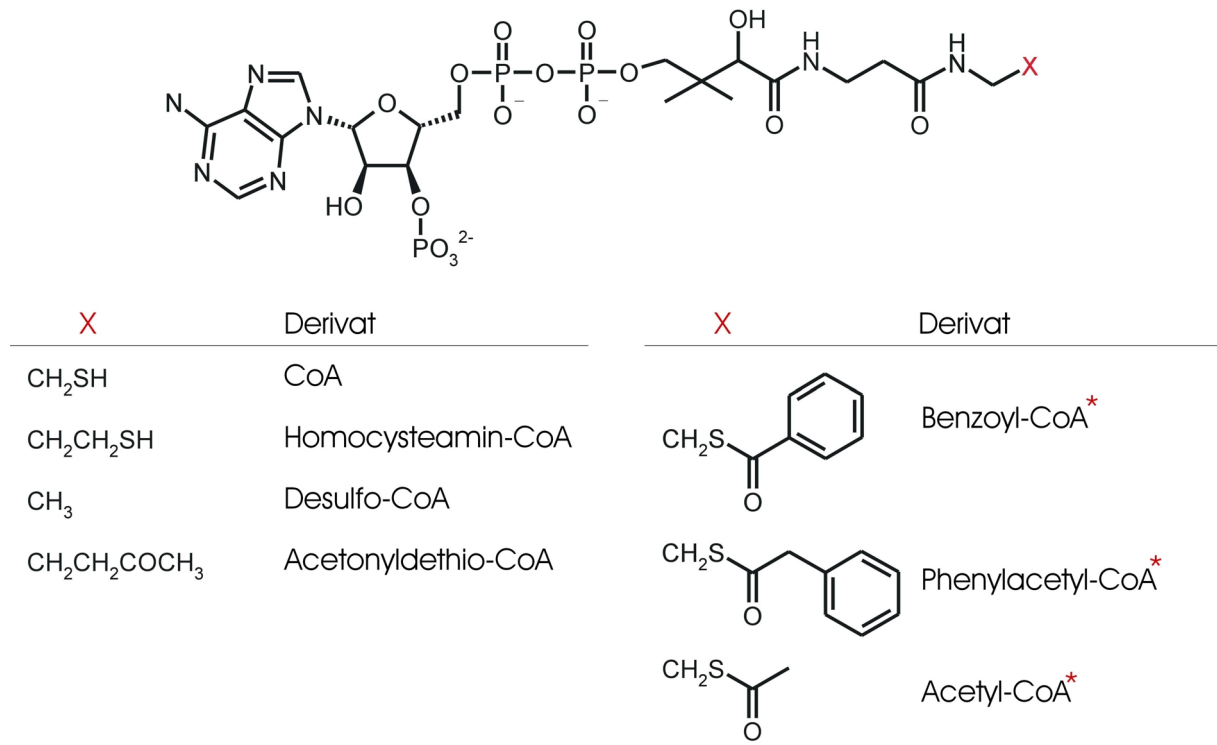


Abb. 11: CoA-Derivate, die für die Modifikation von ACP durch *E. coli* AcpS und *B. subtilis* Sfp als Substrat verwendet wurden. Die mit rotem Stern gekennzeichneten Derivate sind nur mit Sfp getestet worden.

Eine Modifikation von PCP mit CoA-Derivaten *in vivo* würde unweigerlich zur Inaktivierung von NRPS führen, da ihre übrigen Domänen einen Acetylrest z.B. nicht prozessieren können. Aus diesem Grund besitzen die meisten NRPS-Systeme eine besondere Thioesterase (Thioesterase II, Te II), die für die Deacylierung solcher fehlbeladener PCP zuständig ist (97), so dass die NRPS-Aktivität wieder hergestellt werden kann.

2.2.5 CP-PPTase Erkennung

Aufgrund der ähnlichen Struktur der CP blieb lange Zeit die Frage offen wie die verschiedenen PPTasen zwischen ihren Proteinsubstraten unterscheiden können. Die AcpS-ACP-Cokristallstruktur konnte zumindest einen Hinweis auf die Wechselwirkung zwischen PPTase und CP geben (78). Es wurde festgestellt, dass die meisten Wechselwirkungen zwischen Helix 2 des CP und Helix 1 von AcpS stattfinden (Abb. 12).

Inzwischen sind eine Reihe von Proteinen bekannt, die in Lösung große, unstrukturierte Bereiche aufweisen (98). Induziert durch Bindung an einen Partner, z.B. eine bestimmte DNA Sequenz, erfahren sie eine Konformationsänderung. Beispielsweise ist die DNA-Bindedomäne von GCN4 in Abwesenheit von DNA unstrukturiert, faltet sich jedoch in eine stabile, helikale Struktur, wenn die kongrate AP-1-Stelle gebunden wird (99). CP müssen mit vielen

verschiedenen Domänen wechselwirken. Besonders ACP müssen sich verschiedenen Enzymen und Substraten anpassen. Zhang *et al.* konnten z.B. zeigen, dass die Interaktion der *E. coli* β -Ketoacyl-ACP Synthase III (FabH) mit ACP, wie im Fall von *B. subtilis* ACP mit AcpS, über Wechselwirkungen mit Helix 2 erfolgt (100). Eine andere Studie zeigte, dass die interagierenden AS-Reste des ACP je nach Interaktionspartner variieren können, viele davon befinden sich jedoch im Bereich der Helix 2 (101). Die Struktur des ACP aus *Mycobacterium tuberculosis* zeigte überraschenderweise einen unstrukturierten C-Terminus, der möglicherweise an das Fettsäuresubstrat angepasst werden kann und so verschiedene Strukturen annimmt (64). Besonders erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen, die zeigten, dass die Struktur von ACP pH-abhängig ist (102) und dass die Protonen der Helix 2 in NMR-Untersuchungen an *E. coli* ACP sehr viel schneller austauschen, als die in Helix 1 oder 3 (103). Dies deutet auf einen dynamischen Auf- und Abbau der Helix 2 hin. ACP ist also ein hochdynamisches, je nach Situation teilweise ungefaltetes Protein, das seine Struktur dem jeweiligen Interaktionspartner und Substrat anpassen kann, auch wenn die wechselwirkenden AS häufig die gleichen sind.

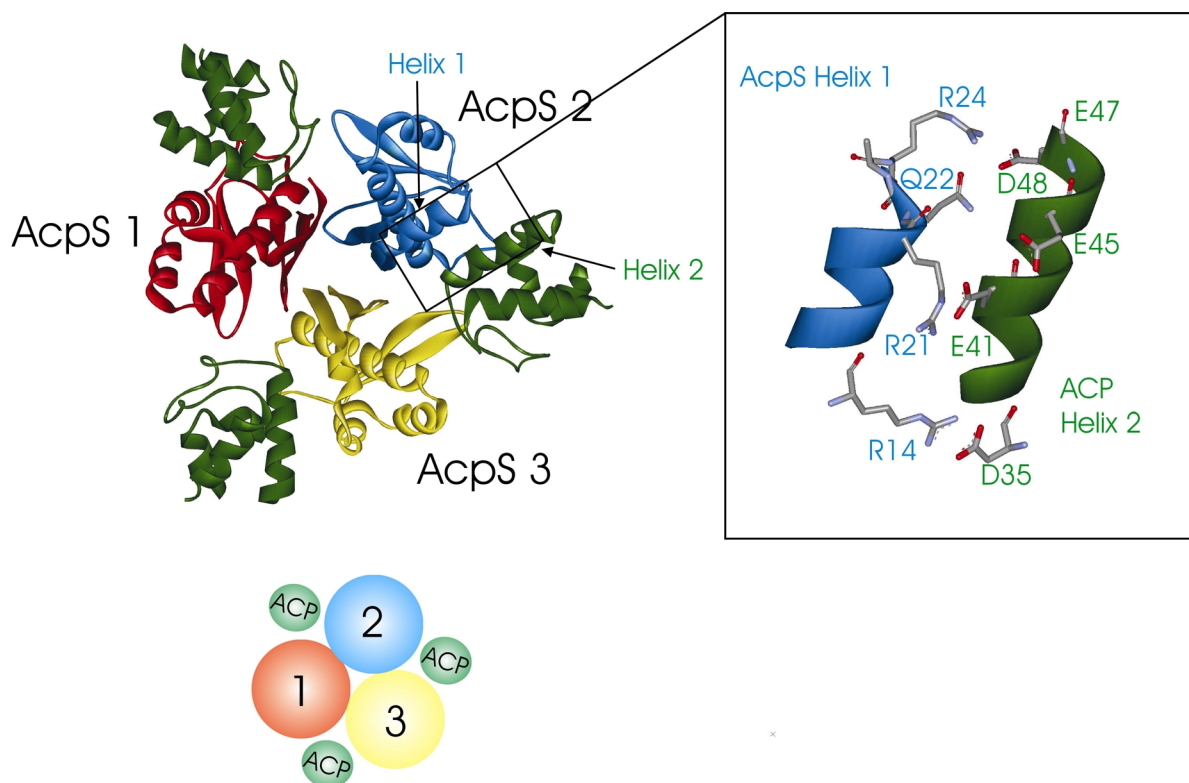


Abb. 12: Cokristallstruktur von *B. subtilis* AcpS mit kognatem ACP. Das Rechteck zeigt die Ausschnittsvergrößerung der Helices 1 von AcpS und 2 von ACP. Zwischen diesen beiden Helices finden sich die meisten Wechselwirkungen.

2.3 NRPS A-Domänen

2.3.1 Die A-Domäne

Die A-Domäne ist für die Selektion der Produktbausteine verantwortlich und bestimmt somit die Primärsequenz des Produkts. Dies wird durch gleichzeitige Selektion des Amino- oder Carboxysäuresubstrats und dessen Aktivierung als entsprechendes Acyladenylat unter ATP Verbrauch erreicht (Abb. 13) (34,104,105).

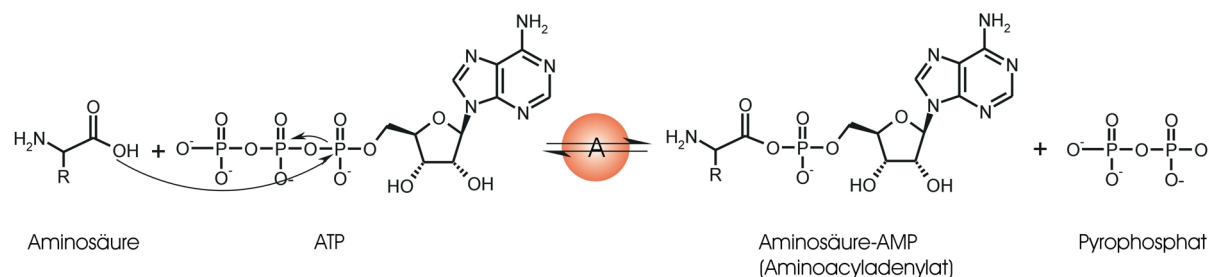


Abb. 13: Aktivierung einer AS durch die A-Domäne. Die A-Domäne katalysiert den nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe auf das α -Phosphat von ATP. Dabei werden das Acyladenylat und Pyrophosphat gebildet.

Inzwischen sind zwei Kristallstrukturen von A-Domänen bekannt. Die Kristallstruktur der Phenylalanin aktivierenden Gramacidin S-Synthetase A (106), GrsA (im weiteren PheA genannt) aus *Bacillus brevis*, erlaubte die Zuordnung der AS-Reste, die maßgeblich an der Koordination des Substrats beteiligt sind. Es zeigte sich, dass diese Reste, mit der Ausnahme von K517, in einem 100 AS umfassenden Bereich zwischen Core A4 und A5 liegen (Tab. 2). Genauere Analyse dieses Bereichs in verschiedenen A-Domänen führte zur Einführung eines „nichtribosomalen Codes“, der es erlaubt die Selektivität von A-Domänen aufgrund ihrer Primärsequenz vorherzusagen (32). Dieser Code war zunächst auf AS aktivierende A-Domänen beschränkt, konnte jedoch durch eine weitere Kristallstruktur der 2'-3'-dihydroxybenzoat(DHB)aktivierenden A-Domäne DhbE aus *Bacillus subtilis* (107) auf carboxysäureaktivierende A-Domänen ausgedehnt werden. In Abb. 14 ist die Extraktion der selektivitätsverleihenden AS aus der Primärsequenz exemplarisch am Beispiel von DhbE gezeigt.

Tabelle 2: Core-Motive der A-Domänen

Core-Motiv	Sequenz	Core-Motiv	Sequenz
A1	L(TS)YxEL	A6	GELxJGx(VL)ARGYL
A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D	A7	Y(RK)TGDL
A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG	A8	GRxPxQVKIRGxRIELGEIE
A4	FDxS	A9	LPxYM(IV)P
A5	NxYGPTE	A10	NGK(VL)DR

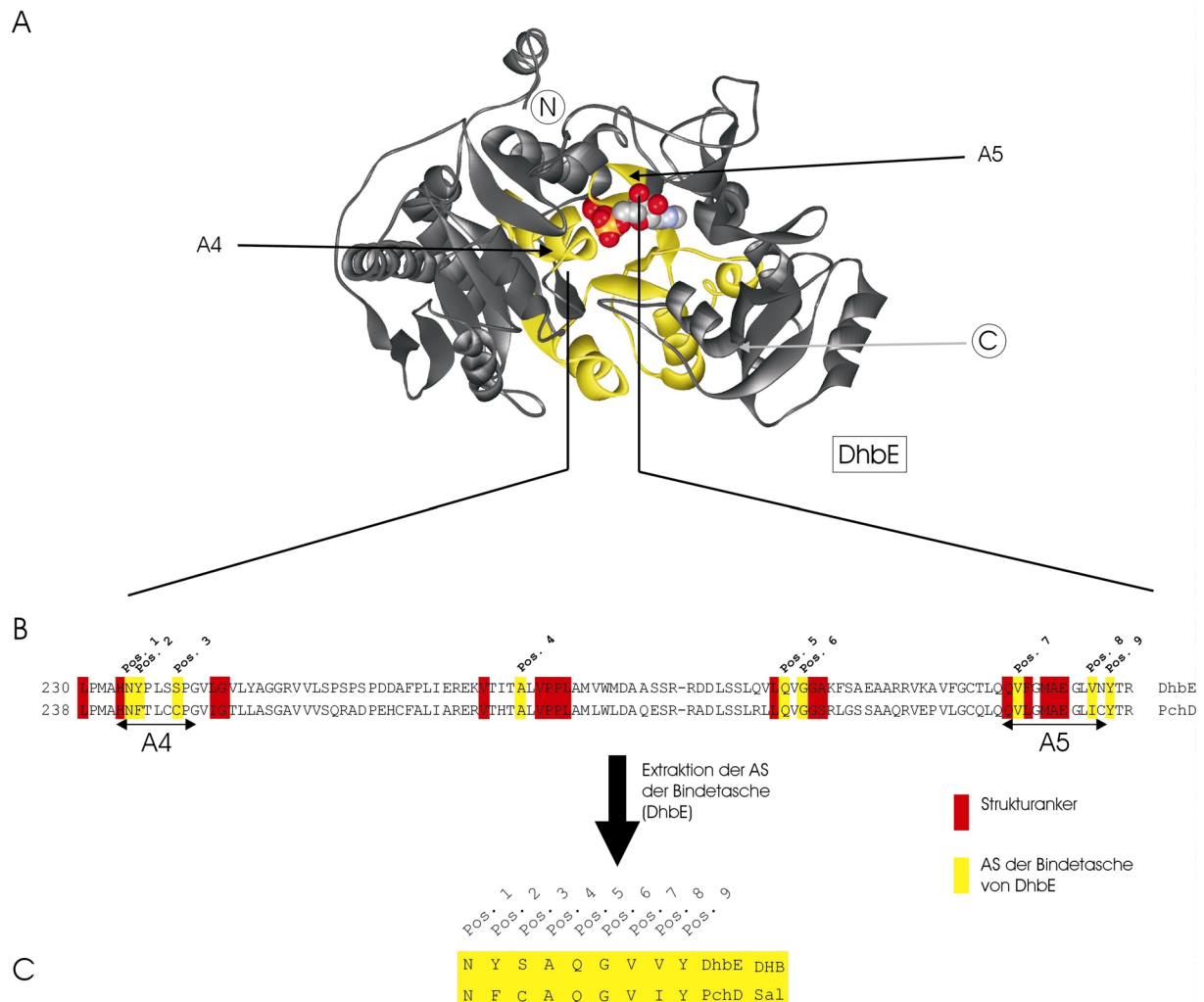


Abb. 14: Extraktion der AS der Bindetasche am Beispiel von DhbE. **A.** Struktur von DhbE. Die Region der Bindetasche zwischen Core A4-A5 ist gelb dargestellt. **B.** Partielles Sequenzalignment der carboxysäureaktivierenden A-Domänen DhbE und PchD, das die Strukturanker (rot) und die neun AS der Bindetasche (gelb) enthält, basierend auf der DhbE Struktur. **C.** Extraktion der AS der Bindetasche führt zur Erweiterung des nichtribosomalen Codes für dihydroxybenzoat- (DHB) und salicylataktivierenden (Sal) A-Domänen. Dieser, nun universelle Code, erlaubt die Vorhersage der Substratspezifität auch für nicht charakterisierte A-Domänen. Die Nummerierung der Positionen in GrsA differiert etwas von der hier gezeigten.

2.3.2 Vergleich mit tRNA-Synthetasen

NRPS A-Domänen katalysieren die gleiche Reaktion wie andere adenylatbildende Enzyme (108), so z. B. die Aminoacyl tRNA-Synthetasen (109-111). Die tRNA-Synthetasen sind in der ribosomalen Proteinbiosynthese für die AS Aktivierung zuständig. Sie katalysieren, wie die A-Domänen, die Bildung des Aminoacyladenylats unter ATP-Verbrauch und verknüpfen die AS anschließend mit dem 2'- oder 3'-OH der tRNA (1). Diese Enzyme gleichen den A-Domänen sowohl in ihrer Aufgabe, als auch in der Art der Substrataktivierung. Dennoch besteht keine Ähnlichkeit zwischen tRNA Synthetasen und A-Domänen auf Sequenzebene oder strukturell (108-111). Die A-Domänenstruktur weist hingegen strukturelle Ähnlichkeiten zur Struktur der

Luciferase aus *Photinus pyralis* (112) auf. Beide Enzyme sind strukturell nahezu identisch und beinhalten eine kleine C-terminale und eine große N-terminale Untereinheit. Die Substratbindetasche befindet sich am Interface zwischen beiden Untereinheiten. Entgegen eines Modells, in dem beiden Untereinheiten sich während der Katalyse relativ zueinander bewegen (106,112), zeichnen eine neuere Luciferasestruktur (113) und die DhbE-Strukturen (107) ein anderes Bild. Die DhbE-Strukturen zeigen drei Momentaufnahmen der Katalyse, nämlich ohne Substrat, mit gebundenem DHB und AMP sowie mit dem Produkt DHB-Adenylat. Es zeigte sich, dass im Verlauf der Katalyse nur relativ kleine strukturelle Veränderung im sog. *p*-loop (114) („*phosphate-binding loop*“ oder „*Walker A motif*“, Core A3 (s. Tab. 2)) vorkommen. Der *p*-loop befindet sich am Eingang der katalytischen Tasche, die er im Verlauf der Katalyse verdeckt, vermutlich um ATP vom umgebenden Wasser abzuschließen und die Katalyse zu starten (107).

2.3.3 Inhibierung von Aminoacyl-tRNA Synthetasen

tRNA-Synthetasen können durch Aminoacyladenylat Analoga inhibiert werden (115-118). Bei den verwendeten Inhibitoren handelte es sich in den meisten Fällen um 5'-O-[N-(Aminoacyl)-sulfamoyl] Adenosin Derivate (Abb. 15).

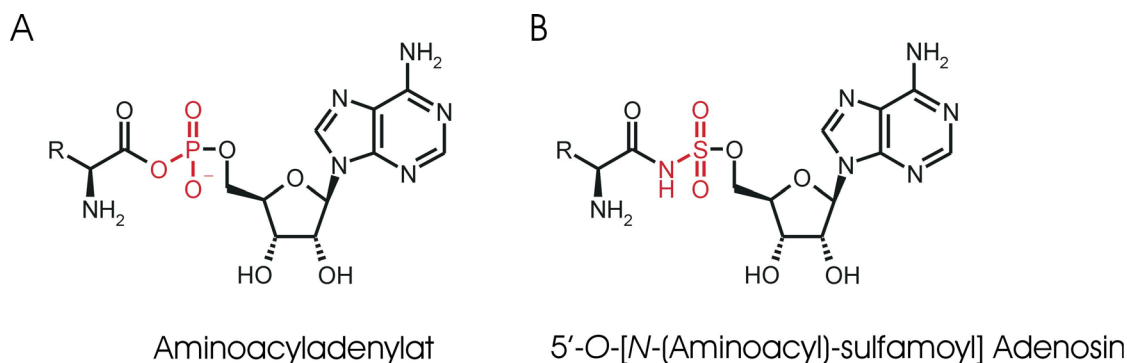


Abb. 15: A. Sowohl tRNA-Synthetasen, als auch A-Domänen katalysieren die Bildung des Aminoacyladenylats. B. tRNA-Synthetasen sind erfolgreich durch Sulfamoyl-Analoga des Aminoacyladenylats inhibiert worden.

So konnte z. B. die *E. coli* Alanyl-tRNA-Synthetase durch das Alanylderivat dieser Verbindung inhibiert und in seiner Gegenwart kristallisiert werden (119), was nicht nur Einblicke in die Produktbindung sondern auch in die Katalyse erlaubte. Cusack und Mitarbeiter nutzten eine solche Verbindung, um strukturelle Veränderung der *T. thermophilus* Lysyl-tRNA-Synthetase während der Katalyse zu studieren (118). Auch die Natur macht sich solche Verbindungen zunutze. So findet sich das Antibiotikum Ascamycin (120) im Fermentationsmedium von *Streptomyces* spp. Dabei handelt es sich um ein Nucleosidantibiotikum, und zwar dem 2-chloro Ala-Derivat der hier vorgestellten Adenylatanaloga. Es kann vermutet werden, dass Ascamycin

den *Streptomyces* zur Verteidigung gegen andere Bakterien dient, indem es die ribosomale Proteinbiosynthese hemmt.

Solche Produktanaloga können also nicht nur zur effektiven Inhibierung der enzymatischen Aktivität verwendet werden, sondern dienen ebenfalls der Aufklärung enzymatischer Mechanismen, was sie aufgrund der Ähnlichkeit in der Katalyse auch für A-Domänen interessant macht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die A-Domäne GrsA-A, als auch SrfA-C-A durch die entsprechenden Phe- bzw. Leu-Derivate dieser Analoga inhibiert werden (85). Die Effizienz der Inhibierung ist vergleichbar mit der, die für tRNA-Synthetasen bestimmt wurde und die Untersuchungen zeigten eine gewisse Universalität dieser Inhibitoren.

2.4 Aufbau und Modifikation der bakteriellen Zellwand

Die Zellwand Gram-positiver Bakterien unterteilt sich in die Zytoplasmamembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, und das Peptidoglykan (Murein), ein netzwerkartiges Riesenmolekül. Dieses setzt sich aus N-Acetylglucosamin/N-Acetylmuraminsäure Polymeren zusammen, die über Oligopeptide verbunden werden, um die Bakterienzelle ganz umspannen zu können (121). Die anionischen Teichonsäuren sind ein wichtiger Bestandteil der Zellwand (122,123). Sie lassen sich in die Wandteichonsäuren (WTA) und die Lipoteichonsäuren (LTA) unterteilen. WTA sind über Phosphodiesterbrücken mit der Muraminsäure des Peptidoglykans verbunden. LTA hingegen sind über die Fettsäurenreste ihrer Glykolipidkomponente in der äußeren Schicht der Zytoplasmamembran verankert. Durch ihren anionischen Charakter verleihen sie der Zellwand eine stark negative Ladung, die durch den niedrigen pH-Wert aufgrund der protonenmotorischen Kraft noch verstärkt wird. In nichtsporulierenden Zellen enthalten WTA und LTA estergebundene D-Ala Reste. Das Ausmaß dieser Modifikation arbeitet der negativen Ladung entgegen und moduliert mithin ihre Dichte (123).

Das *dlt*-Operon enthält fünf *ORFs*, die für die Protein DltA-E kodieren. Diese Protein sind für die Modifikation der Teichonsäuren mit D-Ala verantwortlich (Abb. 16) (122-125). Das A-Domänenverwandte DltA aktiviert im Zytoplasma unter ATP-Verbrauch D-Ala als Aminoacyladenylat und transferiert es auf das 4'PP des *holo*-D-Alanyl Carrier Protein (DCP), DltC (Abb. 16) (75,126). DltB ist ein hydrophobes Protein, welches das so aktivierte D-Ala durch die Zytoplasmamembran transportiert (125). Schließlich wird D-Ala, katalysiert durch DltD, auf LTA oder WTA übertragen (Abb. 16) (124). DltD ist vermutlich ein multifunktionales Protein, das auch Thioesteraseaktivität gegenüber D-Ala-beladenem FAS-ACP zeigt (127), um eine Anhäufung von D-Ala-*holo*-ACP zu verhindern. Die Rolle von DltA ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Das Fehlen der D-Ala Modifikation kann verschiedene Phänotypen hervorrufen. In *Staphylococcus aureus* ist z. B. bekannt, dass eine Inaktivierung des *dlt* Operons zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber positiv geladenen, membranschädigenden Peptiden führt, die u.a. vom Menschen zur Verteidigung gegen bakterielle Infektionen produziert werden (124). Außerdem ist diese *S. aureus* Mutante mehr als dreimal sensibler gegenüber dem Peptidantibiotikum Vancomycin (128). In *B. subtilis* beschränkt sich dieser Effekt auf eine leicht erhöhte Empfindlichkeit gegenüber endogenen lytischen Enzymen (Autolyse) und β -Lactamen (129).

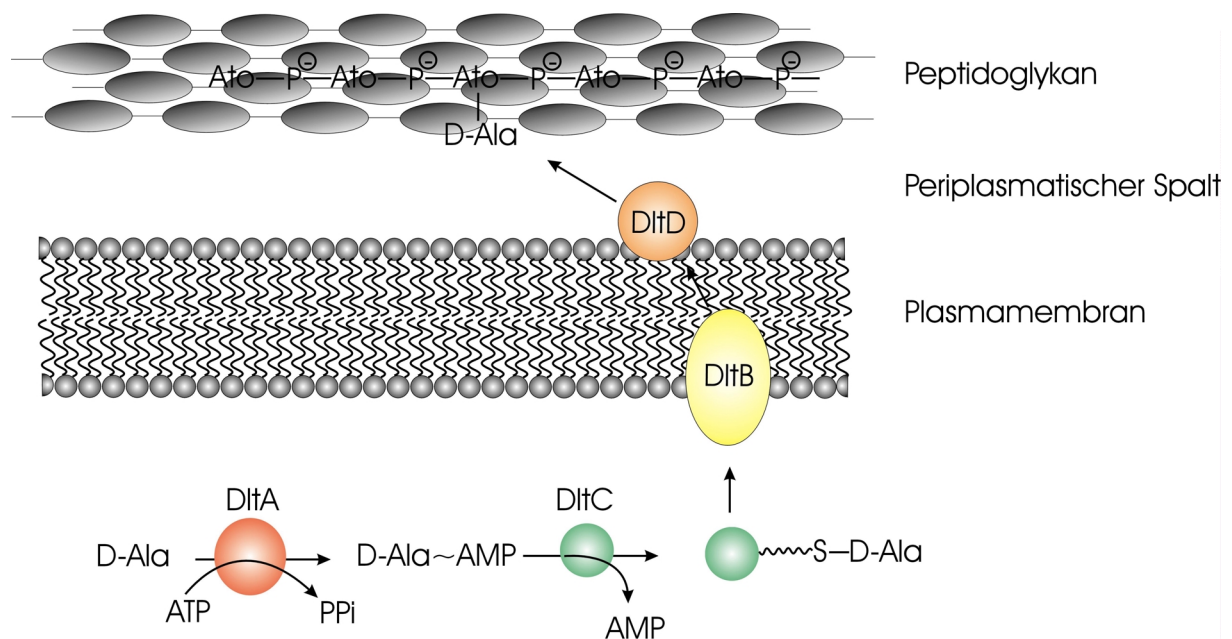


Abb. 16: Die Zellwand Grampositiver Bakterien mit Plasmamembran, periplasmatischem Spalt und Peptidoglykan. Die im Peptidoglykan enthaltenen, phosphatverbrückten Wand- oder Lipoteichonsäuren werden durch „Ato“ (Alditol) symbolisiert. Das A-Domänen ähnliche DltA aktiviert D-Ala als Acyladenylylat und belädt anschließend das DltC (DCP) damit. DltB transportiert das so aktivierte D-Ala durch die Membran und DltD überträgt D-Ala schließlich auf die Teichonsäuren im Peptidoglykan, um die Ladung der Zellwand zu modulieren.

2.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es die Phosphopantetheinylierungsreaktion im Gram-positiven Organismus *B. subtilis* sowie im Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen. Dazu sollte zunächst die zuvor begonnenen Untersuchung von *B. subtilis* AcpS und Sfp hinsichtlich ihrer Spezifitäten für verschiedene CP-Typen komplementiert werden. Anschließend sollte die Untersuchung der ungewöhnlichen Situation in *P. aeruginosa* erfolgen. Dieser Organismus enthält wie oben erwähnt nur eine PPTase, die hier hinsichtlich ihres Spezifitätsspektrums analysiert werden sollte.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit sollte sich mit der Erkennung des CP durch PPTasen beschäftigen. Dazu sollten Untersuchungen eines PCP/ACP-Hybrids hinsichtlich der Erkennung durch *B. subtilis* AcpS und Sfp erfolgen. Außerdem sollte eine Mutationsanalyse von AcpS die Frage klären, ob die AcpS-Typ und Sfp-Typ PPTasen evolutionär miteinander verwandt sind, und ob sich die Substrattoleranz des AcpS eventuell auf weitere CP-Typen ausdehnen lässt.

Ein weiterer Abschnitt sollte sich mit den zuvor untersuchten Aminoacyl-Sulfamoyl Inhibitoren beschäftigen, die von A. Neumüller in die AG Marahiel eingeführt worden waren (85). Dabei sollten die begonnen Untersuchungen fortgeführt und die Verwendbarkeit dieser Inhibitoren für weitere A-Domänen getestet werden.

3. Material

3.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autom. DNA-Sequenzanalyse	PE Applied Biosystems ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Chromatographiesäulen	HiLoad 16/60 Superdex 75 oder 200 prep grade, HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade, Resource S 6 mL, Source S, Amersham Biosciences
Dokumentation von DNA-Agarosegelen	Videokamera Cybertech CS 1
Elektroporationssystem	Biorad Gene Pulser II
Massenspektrometer	Hewlett Packard Series 1100
FPLC-System	Pharmacia FPLC-System bestehend aus: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500 (2x), Uvicord Opt. Einheit UV-1, Uvicord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100 oder Pharmacia AEKTA Prime
HPLC-System	Hewlett Packard Series 1100 HPLC-System mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und HP-Chemstation oder Pharmacia AEKTA Purifier System
HPLC-Trennsäulen	Nucleosil 120/3 250 3 C18, MachereyNagel
Mikrotiterplattenlesegerät	Perkin Elmer Viktor ² mit Injektionseinheit
MS/MS-System	QStar XL hybrid LC/MS/MS, Applied Biosystems
Photometer	Pharmacia Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Software	Lasergene DNASTar 5.0 von GATC; Clone Manager5 von Scientific and educational Software, O 7.0 (Jones), MOLMOL, DENZO (Ottwinowski), Adobe Photoshop 5.5 und Illustrator 8.0; Microsoft Office 2000, CorelDraw
Speed-Vac	Uniequip Univapo 150 H
Szintillationszähler	Packard 1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp PCR System2
Wasserbad	Infors Aquatron Rundschüttelmaschine
Wasserentionisierer	Seral Seralpur Pro 90 CN
Zellaufschluß	Sim Aminco French Pressure Cell Press
Zentrifugen	Heraeus Mikrofuge pico, Minifuge RF, Sorvall RC 26 Plus, Sorvall RC 5B Plus Eppendorf 5415 D

3.2 Enzyme und Chemikalien

Sofern nicht anders verzeichnet wurden Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Aldrich (Steinheim) in p.a. - Qualität bezogen.

Tabelle 4: Verwendete Produkte

Firma	Produkt(e)
ABI (Foster City, USA)	ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, UK)	PROTEINscript®-PRO
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Hybond N ⁺ -Nylonmembran, Lysozym, Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol, IPTG, Proteinase K, RNase A
Boehringer Mannheim (Mannheim)	Expand™ Long Template PCR System
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt, Casamino acids
Eurogentec (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
Gibco (Eggenstein)	Acrylamid, Bisacrylamid, 10kDa-Proteinleiter
IBA (Göttingen)	Strep-Tactin Sepharose Säulen
Kodak (Rochester, USA)	Röntgenfilm Biomaxx MR und X-omat AR
MachereyNagel (Düren)	Nucleospin Extract
Millipore (Molsheim)	Sterilfilter (0.22 µm), Nitrocellulosefilter (0.025 µM)
NEN (Köln)	[³² P]-Pyrophosphat
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsendonukleasen, DNA- und Proteinmarker, DNA-modifizierende Enzyme
Oxoid (Wesel)	Agar Nr. 1, Trypton
Qiagen (Hilden)	tip20- und tip-100 Anionentauschersäulen, QIAquick-spin PCR purification kit, Ni-NTA-Agarose
Qiagen-Operon (Köln)	Oligonukleotide
Roth (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Ethanol, Methanol, Isopropanol, Szintillationsflüssigkeit
Schleicher & Schüll (Dassel)	Whatmann-3MM Papier
Serva (Heidelberg)	Bromphenolblau, Tween 20

3.3 Mikroorganismen

3.3.1 Klonierungsstämme

Zu Klonierungszwecken wurde neben anderen Stämmen (s.u.) *E. coli* XL10-Gold (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Der Genotyp ist wie folgt: Tet^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r].

Des weiteren kam XL1-blue (Stratagene, Heidelberg) mit folgendem Genotyp zum Einsatz: Tet^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r] (130).

In einigen Fällen wurde *E. coli* sure2 (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Der Genotyp dieses Stamms ist: *e14- (McrA) $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$ endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC* [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10* (Tet^r)].

3.3.2 Expressionsstämme

Zur Genexpression wurde routinemäßig *E. coli* M15 (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Er enthält das Helferplasmid pREP4 (131). Sein Genotyp ist: NaI^s, Str^s, Rif^s, Kan^r, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, F⁻, *lacI*. Gelegentlich wurde auch *E. coli* BL21(Novagen, Schwalbach) (132,133) mit folgendem Genotyp verwendet: F⁻ (*ompT* r_B⁻m_B⁻).

3.4 Vektoren

3.4.1 pQE30, pQE60, pQE70

Der pQE30 (3462 bp), der pQE60-Vektor (3431 bp) und der pQE70-Vektor (3427 bp) gehören zur Familie der pDS-Plasmide (134) und basieren auf dem Plasmid pDS56/RBSII (135). Sie besitzen den T5-Promotor, zwei *lac*-Operatorerkennungssequenzen und eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert ist. Eine *in-frame* Ligation in die *multiple cloning site* (Polylinker, MCS) von pQE60 und 70, bestehend aus *NcoI* (pQE70: *SphI*), *BamHI* und *BglII*, führt zu einer C-terminalen Fusion der rekombinanten Proteine mit sechs Histidinen (His-tag). Im Fall des pQE30 wird sechs Histidine N-terminal an das Protein fusioniert. Die Sequenz ATG der *NcoI*

Restriktionssequenz dient für die Expression als Startcodon. Ebenfalls durch die *NcoI* Restriktionssequenz wird das erste Nukleotid des nachfolgenden Codons zu G umgewandelt. Eine Klonierung in pQE60 mittels *NcoI* und *BamHI*, resultiert zudem in einer Fusion der Aminosäurereste GSRS, kodiert durch die Erkennungssequenzen von *BamHI* und *BglII*, an den C-Terminus des Proteins vor dem His-tag. Das Plasmid verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch Expression des β -Laktamasegens *bla* und repliziert in *E. coli* mittels des ColE1 Replikationsursprunges aus pBR322 (136). Die Genexpression in den Plasmiden pQE60/pQE70 ist aufgrund der optimierten Promotorregion sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher *lac*-Repressorkonzentrationen vollständig unterdrückt werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pREP4 verwendet. Im Unterschied dazu werden Proteine, die von einem in pQE30 klonierten Gen produziert werden mit einem N-terminalen His-tag fusioniert.

3.4.2 pREP4

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) ist mit seinem Replikationsursprung P15A (137) kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE60 in *E. coli* repliziert werden. Es exprimiert den durch das *lacI*-Gen kodierten Lac-Repressor [Farabough, 1978 #1248]. Durch das *neo*-Gen vermittelt es Resistenz gegen Kanamycin. Aufgrund einer Mutation in der RBS von *neo* sollten jedoch nur Konzentrationen von 25 $\mu\text{g/mL}$ zur Selektion eingesetzt werden. pREP4 wurde als Helferplasmid in Kombination mit pQE30, pQE60 und pQE 70 verwendet, um durch die *lac*-Repressorproduktion eine Regulation der Expression der in pQE30 pQE60 und pQE70 enthaltenen Gene zu ermöglichen.

3.4.3 pTZ18

Die Vektoren pTZ18R (2871 bp) und pTZ19R (2870 bp) stellen Derivate von pUC18 und pUC19 dar, die um einen fl-origin erweitert wurden, der die Präparation von ssDNA mittels Helferphagen ermöglicht. Diese Plasmide basieren auf einem ColE1 Replikationsursprung, vermitteln durch ihr *bla*-Gen Ampicillinresistenz und erlauben durch die in das *lacZ'*-Gen integrierte MCS ein Blau-Weiß-Screening auf rekombinante Plasmide. Zusätzlich zum *lac*-Promotor kann die Expression klonierter Gene dank eines T7-Promotors auch mittels der T7-Polymerase durchgeführt werden. MCS von pTZ18R in der Reihenfolge der Orientierung des

lac-Promotors: *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *AvaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *HincII*, *AccI*, *BspMI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*. pTZ19R enthält die MCS in umgekehrter Reihenfolge. GenBank-Accession: L08956 (pTZ18R), L08957 (pTZ19R).

3.4.4 pASK-IBA3

pASK-IBA3 ist ein 3286 bp großer Vektor und ermöglicht die Produktion rekombinanter Proteine mit einer C-terminalen Strep-tag II Fusion (138,139). PCR-Fragmente des zu exprimierenden Strukturgens werden über die in der MCS liegenden *SacII* und *NcoI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor kloniert. Dabei werden unter Verwendung des auf dem Vektor liegenden ATG-Startkodons neben dem Strep-tag vier zusätzliche AS an den N-Terminus des Proteins angehängt. Das Expressionssystem steht unter transkriptioneller Kontrolle des *tet*-Promotors. Der ebenfalls auf dem Plasmid kodierte *tet*-Repressor wird konstitutiv durch den β -Lactamase-Promotor exprimiert. Diese besondere Anordnung garantiert eine ausbalancierte Stöchiometrie zwischen der Anzahl an Repressor Molekülen und der Plasmidkopienzahl. Die Expression des Strukturgens wird solange stringent reprimiert, bis eine effiziente chemische Induktion mit Anhydrotetracyclin vorgenommen wird. Die effiziente Initiation der Translation wird durch die sich an den *tetA*-Promotor/Operator anschließende Tandem-Ribosomenbindungsstelle gewährleistet. Der zusätzlich integrierte Terminator des Lipoprotein Gens verhindert ein mögliches Durchlesen. Neben dem Expressionssystem tragen die Vektoren auch die intergenische Region des filamentösen Phagen *fl*, welche zur Produktion einzelsträngiger Plasmid-DNA genutzt werden kann. Dies ermöglicht die direkte ortsspezifische Mutagenese des rekombinanten Strukturgens nach den gängigen Verfahren. Für die Replikation und Selektion in *E. coli* trägt der Vektor einen entsprechenden Replikationsursprung und das β -Lactamasegen (*bla*), dessen Genprodukt eine Ampicillinresistenz verleiht.

3.5 Medien

Für die Anzucht und Kultivierung von *E. coli* und *B. subtilis* wurde LB-Medium verwendet (140).

Tabelle 5: LB-Medium

LB Medium

Bactotrypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

Gegebenenfalls wurde *E. coli* zu Klonierungszwecken auf Minimalmedium A angezogen.

Tabelle 6: Minimalmedium A

Minimalmedium A (10 x Stock)

	K ₂ HPO ₄	105	g/L
	KH ₂ PO ₄	45	g/L
	NaCitrat	5	g/L
	NH ₄ SO ₄	10	g/L
	Mg ₂ SO ₄ 1g/100 mL	0.1	g/L EK
	CaCl ₂ 1g/ 100 mL	0.04	g/L EK
sterilfiltrieren:	Glucose 40g/100 mL	4	g/L EK
	Biotin/Thiamin 20 mg/100 mL	2	mg/L EK
	Met 500 mg/100 mL	0.05	g/L EK

Als Sporulationsmedium für *B. subtilis* diente Difco-Sporulations-Medium (DSM) (141).

Tabelle 7: DSM-Medium

DSM-Medium	Nutrient	Broth 8	g/L
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.12	g/L
	KCl	1	g/L
	1 M NaOH	0.6	mL
Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit je	Ca(NO ₃) ₂	1	M
1 mL der folgenden Lösungen versetzt:	MnCl ₂	0.1	M
	FeSO ₄	1	mM

Zur Herstellung von Festmediumplatten wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 1.5 % (w/v) Agar Nr.1 versetzt.

3.6 Antibiotika und Zusätze

Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 30minütiges Autoklavieren bei 121°C und 1.5 bar. Antibiotika und andere hitzesensitive Zusätze wurden nach Abkühlung unter 50°C in folgenden Konzentrationen steril zum Medium gegeben:

Tabelle 8: Verwendete Antibiotika

Ampicillin	100	µg/mL (<i>E. coli</i>)
Chloramphenicol	5	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Erythromycin	25	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Lincomycin	1	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Kanamycin	100	µg/mL (<i>E. coli</i>)
	25	µg/mL (<i>E. coli</i> M15)
	10	µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Gentamycin	10	µg/mL (<i>E. coli</i>)
Sucrose	50	mg/mL (<i>E. coli</i>)

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden lediglich diejenigen Methoden genauer beschrieben, die nicht den Standardmethoden entsprechen; sie sind anderweitig (140) ausreichend beschrieben worden und sollen hier nicht genauer erwähnt werden.

4.1.1 Plasmidkonstruktion

Amplifikation von DNA-Fragmenten aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (142) erfolgte entweder mit Vent-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) oder mit dem *Expand long template PCR system* (Roche, Mannheim) nach Vorschrift des Herstellers mit synthetischen Oligonukleotiden (MWG, Ebersberg oder Qiagen-Operon, Köln). Im Folgenden sind Restriktionsschnittstellen unterstrichen und Mutationen fett dargestellt. Die Reinigung der PCR-Fragmente erfolgte entweder mit dem „QIAquick-spin PCR purification kit“, dem „Qiagen gel extraction kit“ (Qiagen, Hilden) oder dem „Nucleospin extract kit“ (MachereyNagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide sind im Anhang in Tab 21 zusammengefasst. Alle Konstrukte wurden auf ihre korrekte Basenabfolge überprüft.

Konstruktion von pQE60[dltC] – Das für DCP kodierende Gen *dltC* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden 5'-DCP B.s. 5'-ata cca tgg att tta aac aag agg-3' und 3'-DCP B.s. 5'-ata aga tct ttt caa ctc aga cag ct-3' aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* MR168 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *NcoI* und *BglII* mit dem ebenso geschnittenen pQE60 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE60[dltC] kodiert für das rekombinante DCP mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE70[PA1165] – Das für PcpS kodierende Gen *PA1165* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden 5'-PA1165 5'-ata gca tgc gcg cca tga acg acc gtc tc -3' und 3'-PA1165 5'-ata aga tct ggc gcc gac cgc cac cag-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *SphI* und *BglII* mit dem ebenso geschnittenen pQE70 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE70[PA1165] kodiert für das rekombinante PcpS mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE70[PA2966] – Das für das *P. aeruginosa* FAS ACP kodierende Gen *PA2966* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF028 5'-ata gca tgc gca cca tcg aag aac gcg-3' und RF029 5'-ata aga tct ttg ctg gtg agc aac gat g-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *Sph*I und *Bgl*II mit dem ebenso geschnittenen pQE70 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE70[*PA2966*] kodiert für das rekombinante FAS ACP (P.a.-ACP) von *P. aeruginosa* mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE70[pvdD1-PCP] – Das für PvdD1-PCP kodierende Genfragment *pvdD1-PCP* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF030 5'-ata gca tgc atc gag cgc ccg gta gc-3' und RF031 5'-ata aga tct caa tcc ctg ggc gaa cg-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *Sph*I und *Bgl*II mit dem ebenso geschnittenen pQE70 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE70[*pvdD1-PCP*] kodiert für das rekombinante PvdD1-PCP (AS-Reste 1067-1140 von PvdD, 9.3 kDa) mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE70[pchE-ArCP] – Das für PchE-ArCP kodierende Genfragment *pchE-ArCP* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF032 5'- ata tgc atg cat ctg ccc ccc gat tcc cg-3' und RF033 5'- ata aga tct gtc cgc gca ggc cag ca-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *Sph*I und *Bgl*II mit dem ebenso geschnittenen pQE70 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE70[*pchE-ArCP*] kodiert für das rekombinante PchEArCP (AS-Reste 1-87 von PchE, 10.5 kDa) mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE60[pvdD2-PCP] – Das für PvdD2-PCP kodierende Genfragment *pvdD2-PCP* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF040 5'-ata cca tgg atc gag cgc ccg gta gc-3' und RF041 5'-ata aga tct gat gca tgc cgc ctg ttc c-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *Nco*I und *Bgl*II mit dem ebenso geschnittenen pQE60 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE60[*pvdD2-PCP*] kodiert für das rekombinante PvdD2-PCP (AS-Reste 2079-2151 von PvdD, 9.2 kDa) mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE60[pchE-PCP] – Das für PchE-PCP kodierende Genfragment *pchE-PCP* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF042 5'-ata cca tgg gcg agt gtc gtc acg

ag-3' und RF043 5'-ata aga tct ggt ctg cac ctg caa gtg g-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *NcoI* und *BglII* mit dem ebenso geschnittenen pQE60 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE60[*pchE-PCP*] kodiert für das rekombinante PchE-PCP (AS-Reste 1340-1425 von PchE, 10.9 kDa) mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE30[pchE-PCP] – Das für PchE-PCP kodierende Genfragment *pchE-PCP* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF046 5'-ata gga tcc ggc gag tgt cgt cac gag-3' und RF047 5'-ata aag ctt ggt ctg cac ctg caa gtg g-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *BamHI* und *HindIII* mit dem ebenso geschnittenen pQE30 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE30[*pchE-PCP*] kodiert für das rekombinante PchE-PCP (AS-Reste 1340-1425 von PchE, 11.4 kDa) mit dem N-terminalen Tag MRGSHHHHHHGS sowie den zusätzlichen C-terminalen AS KLN.

Konstruktion von pQE60[luc] – Die für die *Photinus pyralis* Luciferase kodierende cDNA *luc* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF071 5'-ata gga tcc ggc gag tgt cgt cac gag-3' und RF072 5'-ata aga tct caa ttt gga ctt tcc gcc-3' aus dem Vektor pGL2 basic (Promega, Madison, WY (USA)) amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *NcoI* und *BglII* mit dem ebenso geschnittenen pQE60 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE60[*luc*] kodiert für die rekombinante *Photinus pyralis* Luciferase mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pQE70[hPCP] – Das Plasmid pQE70[*tycC3-PCP*] (35) diene als Templat in einer PCR mit Oligonukleotiden 5'-hPCP 5'-ata gag ctc gtt atg gaa ctt gaa gac gag tat cag gtt gag ctt cc-3' und 3'-hPCP 5'-ata gag ctc aac tac atc tag gga atc tcc gcc gat ctg gaa aa-3'. Die Oligonukleotide enthalten die Sequenzinformation für Helix 2 von *B. subtilis acpA* (kursiv) sowie die für *tycC3-PCP* (Standardschrift). Das resultierende PCR-Fragment enthielt *hPCP* unter Kontrolle des *T5*-Promotors von pQE70. Das Fragment wurde mit *SacI*, die Templat-DNA mit *DpnI* verdaut und das PCR-Produkt wurde anschließend religiert zu pQE70[*hPCP*]. Dieses Plasmid kodiert für das rekombinante hPCP mit dem C-terminalen Tag RSHHHHHH.

Konstruktion von pΔpcpS – Eine 2904 bp großes Fragment, das 1119 bp stromaufwärts und 1057 bp stromabwärts des *PA1165* ORFs enthielt, wurde mittels PCR und Oligonukleotiden RF055 5'-ata gaa ttc ggt tga gcc cga tct tgc-3' und RF056 5'-ata aag ctt ctt tgc ctg gcc gaa

tgg-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut und mit dem ebenso geschnittenen pEX18Ap (143) ligiert, woraus das Plasmid pEX18Ap[5'-*pcpS*-3'] resultierte. Dieses Plasmid diente als Templat in einer inversen PCR mit Oligonukleotiden RF059 5'-ata act agt tca ggc gtt ccc cgg cgt-3' und RF060 5'-ata cat atg ccc acc agt cac gtg gcg-3'. Das resultierende Fragment wurde mit *SpeI* und *NdeI* verdaut und mit einem Fragment ligiert, das *aacC1* Gen (Gentamycin^R) enthielt, welches zuvor mittels PCR und Oligonukleotiden RF061 5'-ata cat atg cgg ttc ggc cag cgg caa-3' sowie RF062 5'-ata act agt ccg aac aac tcc gcg gcc-3' aus pX1918G (144) amplifiziert und anschließend ebenso verdaut worden war. Das resultierende Plasmid pΔ*pcpS* diente anschließend zur Unterbrechung des *PA1165* Gens in *P. aeruginosa*.

Konstruktion von pSYNpcpS und pANTIpcpS – Ein 107 bp großes Fragment, das 86 bp in das *PA1165* (für *PcpS* kodierende) Gen hineinreichte wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden RF069 5'-ata aag ctt gcc acg tgc gga acc gcc-3' und RF070 5'-ata act agt tta ttg cac gcc ggg cag cgc-3' aus chromosomaler DNA von *P. aeruginosa* PA01 amplifiziert, anschließend mit *HindIII* und *SpeI* verdaut und entweder mit dem ebenso verdauten Vektor pUCPKS oder pUCPSK (145) ligiert. Die Ligation mit pUCPKS lieferte das Konstrukt pSYN*pcpS* zur Produktion von sense mRNA eines Teils des *PA1165* Gens, die mit pUCPSK lieferte pANTI*pcpS* zur Produktion der entsprechenden antisense mRNA.

Konstruktion von pQE70[T7-LeuAA4A5] und pQE70[T7-PheAA4A5] – Die Konstrukte pQE70[LeuA/His-T] bzw. pQE70[PheA/His-T] (146) dienten als Templat in einer PCR mit Oligonukleotiden #1 5'-ata gca tgc taa tac gac tca cta tag gga gag gag gta tat acA TGg gag acc gcg ggc ctg-3' (T7-Promotorsequenz in grün, RBS rot, Spacersequenz gelb, Start-ATG in Großbuchstaben) und #2 5'-ata gga tcc gtc ctg atc agg ttt tgg gag cag cc-3' für pQE70[T7-LeuAA4A5] und Oligonukleotiden #3 5'-ata gca tgc taa tac gac tca cta tag gga gag gag gta tat acA TGg gag acc gcg gtc atg-3' (Farbcode s.o.) sowie #4/#6 5'-ata gga tcc ggt taa atc agg ttc cgg caa c-3' für pQE70[T7-PheAA4A5]. Die erhaltenen Fragmente wurden mit *SphI* und *BamHI* verdaut und mit dem ebenso geschnittenen pQE70 ligiert. Die resultierenden Plasmide pQE70[T7-LeuAA4A5] und pQE70[T7-PheAA4A5] kodieren für die rekombinanten Proteine TycC6-A bzw. GrsA-A mit dem C-terminalen Tag GSRSHHHHHH und enthalten einen T7-Promotor mit zugehöriger RBS zur *in vitro*-Transkription und Translation.

Konstruktion von pQE30[acpS] – Das für *B. subtilis* AcpS kodierende Genfragment *acpS* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RF050 5'-ata gca tgc att tac ggc att ggg ctg g-3' und RF051 5'-ata aag ctt gct tga caa cct ttc aat cac a-3' aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* MR168 amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *SphI* und *HindIII* mit dem ebenso geschnittenen pQE30 ligiert. Das resultierende Plasmid pQE30[*acpS*] kodiert für das rekombinante AcpS mit dem N-terminalen Tag MRGSHHHHHHGSAC sowie den zusätzlichen C-terminalen AS KLN.

4.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung der *B. subtilis* AcpS-Mutanten R14A, R14K, K44A, K44D sowie R14KK44D wurde das *QuickChange site directed mutagenesis kit* (Stratagene, Heidelberg) weitestgehend nach Herstellerangaben benutzt. Als Templat für die PCR mit der Pfu-Turbo[®]-Polymerase des Kits diente pTz18R[*acpS*] oder pTz18R[*acpSK44D*] (94). Nach der PCR mit 16 Zyklen wurde das Templat mit *DpnI* verdaut und der PCR Ansatz auf 0.025 µM Nitrocellulosefiltern (Millipore, Mohlsheim) dialysiert. Anschließend wurde *E. coli* XL10Gold mit dem gesamten PCR Ansatz transformiert. Da über diese Methode in *acpS* keine neuen Schnittstellen eingeführt werden konnten, wurde der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung überprüft. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur ortsgerichteten Mutagenese von *acpS*

AcpS Mutante	verwendete Oligonukleotide
R14A	RF081, RF082
R14K	RF083, RF084
K44A	RF077, RF078
K44D	RF057, RF058
R14KK44D	RF083, RF084

Tabelle 10: Sequenzen der Oligonukleotide zur ortsgerichteten Mutagenese von *acpS*

Oligonukleotid	Sequenz
RF057	gac caa tac tat gag ctt tca gag gat cga aaa aac gaa ttt ctc gcg gg
RF058	ccc gcg aga aat tcg ttt ttt cga tcc tct gaa agc tca tag tat tgg tc
RF077	gac caa tac tat gag ctt tca gag gcc aga aaa aac gaa ttt ctc gc
RF078	gcg aga aat tcg ttt ttt ctg gcc tct gaa agc tca tag tat tgg tc
RF081	tgg aca tta ccg agc tta aag cca tcg cct cta tgg ctg ggc
RF082	gcc cag cca tag agg cga tgg ctt taa gct cgg taa tgt cca
RF083	tgg aca tta ccg agc tta aaa aga tcg cct cta tgg ctg ggc
RF084	gcc cag cca tag agg cga tct ttt taa gct cgg taa tgt cca

4.1.3 Zufällige (*random*) Mutagenese

Zur Einführung zufälliger Mutationen wurde ein Protokoll für eine fehlerhafte (*error prone*) PCR entwickelt. Die Verwendung von desoxy Inosin triphosphat (dITP) in einer PCR führt zunächst zur Inkorporation von dITP in die DNA in den ersten Zyklen. In weiteren Zyklen basenpaart Inosin (I) mit T, C oder A (aber nicht G), was zur Einführung von zufälligen Mutationen führt (1). Zu diesem Zweck wurde zunächst eine herkömmliche PCR mit dem Templat pQE70[*LeuA4A5*] (85) durchgeführt. Dieses Konstrukt enthält das für die SrfA-C- A-Domäne kodierende Gen. Dieses Gen enthält Restriktionsschnittstellen, um den Bereich, der für Core A4-A5 codiert herauszuschneiden. Mit den Oligonukleotiden RF025 sowie RF026 (s. Anhang Tab. 21) wurde ein 640 bp großer Bereich amplifiziert, der die Region zwischen Core A4-A5 der A-Domäne enthält. Dieses PCR Fragment diente dann als Templat in der folgende, *error prone* PCR. Für die *error prone* PCR wurden jeweils 4 Ansätze hergestellt. In jedem Ansatz wurde ein dNTP in der Konzentration 20 µM eingesetzt und zusätzlich 200 µM dITP zugegeben, alle anderen dNTP waren 200 µM. Des weiteren enthielten die 50 µL Ansätze 10 mM Tris/HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 1 U Taq-Polymerase (Promega, Mannheim) und 0.4 µM der Primer RF023 und RF024 (s. Anhang, Tab. 21). Das verwendete PCR-Programm war wie folgt:

Tabelle 11: PCR Programm zur *error prone* PCR

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	95	2:00
30	95	1:00
	50	1:30
	72	2:30

Anschließend wurden das Templat mit *DpnI* verdaut. Die vier PCR Ansätze wurden vereinigt, mit *ClaI* und *SacI* verdaut und dann mit dem ebenso geschnittenen pQE70[*LeuAA4A5*] ligiert. 25 der so generierten Mutanten wurden zur Feststellung der Mutageneseeffizienz sequenziert.

4.1.4 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (147). Zu diesem Zweck wurde das *ABI Prism dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction kit* (ABI, Foster City (USA)) weitgehend nach Herstellerangaben verwendet. Für die Sequenzierreaktion wurden 100 ng DNA pro kbp, 5 pmol Primer und 3-4 µL Sequenziermix des Herstellers eingesetzt. Die Anzahl der Zyklen während der PCR wurde entgegen den Herstellerangaben von 25 auf 30 erhöht. Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgte schließlich mit dem *Abi Prism 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

4.1.5 *In vivo* Generierung von Antisense-RNA

Antisense-RNA ist eine RNA Sequenz, die komplementär zu einer Ziel-RNA ist. Die Wechselwirkungen der Ziel RNA mit ihrer antisense-RNA ist ein in Bakterien, Pflanzen und anderen höheren Organismen natürlich vorkommender Prozess z.B. während des Splicens, bei der RNA Editierung und rRNA Modifikation. Dieser Prozess wird auch als *RNA interference* (RNAi) bezeichnet (148). Die Entdeckung von RNAi in *Caenorhabditis elegans* eröffnete neue Einblicke in die posttranskriptionale Genregulation (149). Sog. siRNA (*short interfering RNA*), alternative Bezeichnung einer Art von antisense RNA) ist eine Schlüsselkomponente in diesem Prozess. Diese hat ihren Ursprung in dsRNA (*double stranded RNA*), welche in *Drosophila* durch ein RNaseIII-ähnliches Enzym, DICER, in ca. 20 nt große Stücke verdaut wird. SiRNA bindet anschließend die komplementäre Ziel-RNA und veranlasst den Abbau

des siRNA-mRNA Komplexes durch RISC (*RNA induced silencing complex*) (150). Dieser Prozess dient z.B. der Abwehr von genomverändernden, exogenen Transposons (151-154), wird aber auch von Viren zur Abschaltung von Wirtsgenen genutzt. In *C. elegans* ist ein ähnlicher Prozess während der Larvenentwicklung beobachtet worden. *Short temporal RNA* (stRNA, ebenfalls eine Art von antisense RNA) ist in den zeitlichen Ablauf der Entwicklung involviert (155-157). Allerdings ist dieser Prozess nicht auf die Abschaltung von Genen beschränkt, es können z. B. mRNAs, die Sekundärstrukturen ausbilden, für die Translation durch Entfaltung der RBS erst zugänglich gemacht werden (158).

Kürzlich hat man sich zu nütze gemacht, dass sich dieser Prozess auch künstlich auslösen lässt. Da *C. elegans* ein natürlicher Fressfeind von *E. coli* ist, kann dsRNA über die Nahrungskette durch plasmidtragende *E. coli* in *C. elegans* eingebracht werden. Die von den Plasmiden transkribierte RNA kann dann als antisense RNA im RNAi-Prozess wirken. Auf diese Weise konnten, neben vielen anderen, z. B. 417 Gene identifiziert werden, die in der Körperfettregulation von *C. elegans* involviert sind (159,160).

In *E. coli* und anderen Prokaryonten ist RNAi ebenfalls bekannt, jedoch weit weniger komplex geregelt (Abb. 17). Bindet siRNA die Ziel-RNA, so stellt dieser Komplex ein Substrat für die RNase III dar (148). Die Kopienzahl von ColE1 und R1-Plasmiden wird z.B. auf diese Weise, dargestellt in Abb. 17 A, reguliert. Im bakteriellen Chromosom ist die antisense RNA im Gegensatz dazu jedoch transcodiert (d.h. nicht vom gleichen Locus), wodurch nur partielle Komplementarität zwischen antisense- und Ziel-mRNA erreicht wird (148).

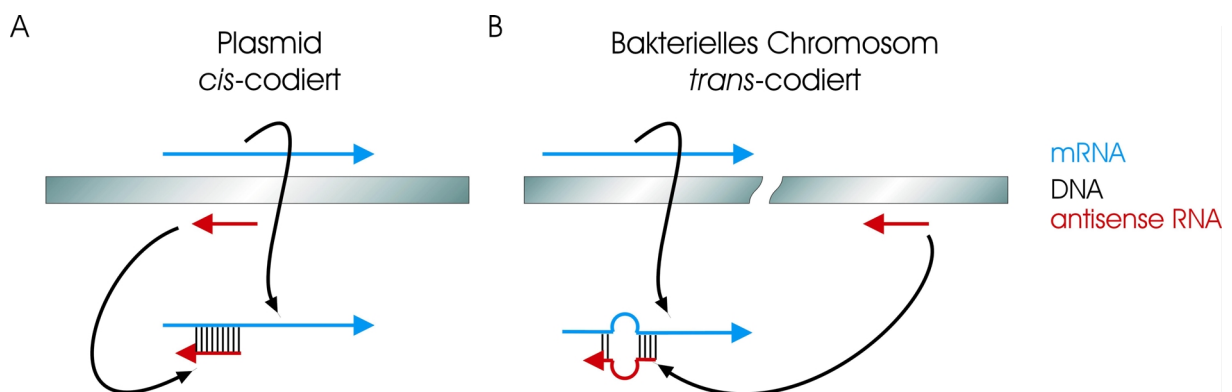


Abb. 17: Aktionsweise von antisense RNA in Prokaryonten. A. Plasmidcodierte (cis, also vom gleichen Locus) antisense RNA wird zur Kontrolle der Kopienzahl von Plasmiden verwendet. B. Im Chromosom wird antisense RNA trans-codiert und ist nur partiell komplementär zur Target mRNA.

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Gene durch plasmidcodierte RNA abgeschaltet werden kann (161). Getestet wurde dies für die *lon* RNA mit sowohl sense RNA, als auch mit antisense RNA, wobei in beiden Fällen ein Phänotyp ähnlich einer Deletionsmutante erzeugt

werden konnte. Um sich diesen Effekt für *PA1165* zunutze zu machen, sind die Plasmide pSYNpcpS und pANTIpcpS, wie oben beschrieben, konstruiert worden; pSYNpcpS codiert für ca. 100 nt RNA mit Sequenz des codierenden Strangs von *PA1165*, pANTIpcpS hingegen für die entsprechende RNA komplementär zum codierenden Strang. Von diesen 100 nt liegen 20 vor dem ATG Startcodon von *PA1165* und enthalten somit die putative RBS, die restlichen 80 nt sind Teil des Gens. Diese Plasmide wurden von M. Schobert aus der AG Prof. Dr. D. Jahn (TU Braunschweig) verwendet, um *PA1165* in *P. aeruginosa* gezielt abzuschalten (s. Ergebnisse).

4.1.6 *In vitro* Transkription und Translation

Zur *in vitro* Produktion von SrfA-C-A und GrsA-A wurde das PROTEINscript®-PRO (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire (UK)) nach Herstellerangaben verwendet. Als Templat wurden entweder die oben beschriebenen Plasmide pQE70[T7-LeuAA4A5] und pQE70[T7-PheAA4A5] oder PCR Produkte verwendet. Diese PCR-Produkte enthielten die T7-Promotorsequenz, eine RBS, sowie eine gegenüber den Plasmiden nach Herstellerangaben optimierte Spacersequenz und wurden im Falle von SrfA-C-A mit Oligonukleotiden RF067 5'-ata gca tgc taa tac gac tca cta tag gga gaa gga gga cag ctA TGg gag acc gcg ggc ctg gtc-3' (T7-Promotorsequenz in grün, RBS rot, Spacersequenz gelb, Start-ATG in Großbuchstaben) und #2 5'-ata gga tcc gtc ctg atc agg ttt tgg gag cag cc-3' erzeugt. Für das PCR-Produkt von GrsA-A wurden Oligonukleotide 5'-ata gca tgc taa tac gac tca cta tag gga gaa gga gga cag ctA TGg gag acc gcg gtc atg-3' (Farbcode s.o.) und #4/#6 5'-ata gga tcc ggt taa atc agg ttc cgg caa c-3' verwendet. Die 50 µL Ansätze enthielten 1 µg Plasmid DNA, 0.5-2 µg PCR DNA, 3 µL [³⁵S]-Met und im Falle der Plasmide 2 nM Rifampicin zur Unterdrückung der β-Lactamaseproduktion des vektorcodierten *bla* Gens durch die *E. coli* Polymerase des hier verwendeten *E. coli* S30 Extrakts. Des weiteren enthielten die Ansätze 2 µL der beigegefügt T7 RNA Polymerase, 5 µL des 1 mM AS-Mixes ohne Met und 3 µL 500 µM Met. Die Reaktionsgemische wurden 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend entweder durch ATP/PP_i-Austausch (s. 4.3.3) oder SDS-PAGE (12.5% Lämmli Gele) und Radiographie analysiert.

4.1.7 Deletion von *PA1165*

Zur Deletion von *PA1165*, welches für PcpS kodiert, wurde das Plasmid pΔpcpS eingesetzt. Dieses Plasmid (Abb. 18) enthält die homologen Bereiche für einen erfolgreichen

Doppelcrossover; das *PA1165* Gen ist durch eine Gentamycin Resistenzkassette ersetzt. Außerhalb der homologen Bereiche enthält der Vektor das *B. subtilis* Gen *sacB* sowie das *bla* Gen, das Ampicillin/Carbenicillinresistenz verleiht. Das *sacB* Gen kodiert für die Levansucrase (6- β -D-fructosyltransferase), die Hydrolyse von Sucrose (2,6- β -D-fructan) und Synthese des Fructosepolymers Levans katalysiert (162). Das Gen ist in vielen Bakterien letal, wenn Sucrose zugegen ist. Der Grund für die Letalität ist allerdings bisher unbekannt.

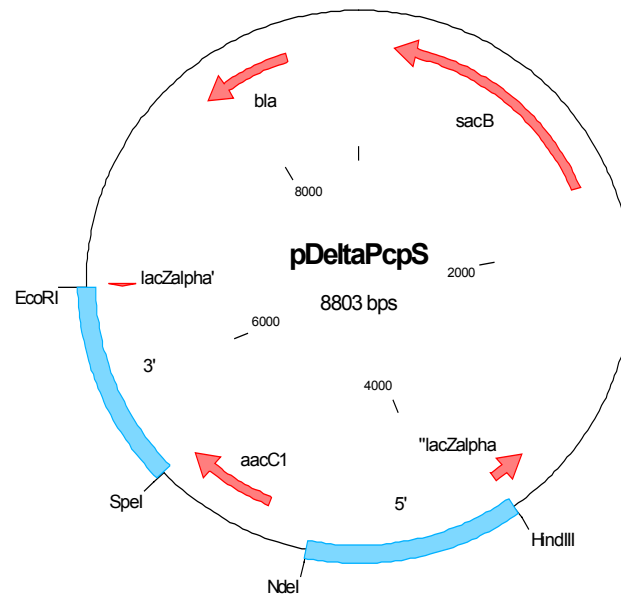


Abb. 18: Der Vektor p Δ pcpS. Die blauen Bereiche repräsentieren die 5'- und 3'-homologen Bereiche des *PA1165* Gens, *aacC1* ist das Gentamycin^R-verleihende Gen. Außerdem enthält der Vektor das *bla* Gen, das Ampicillin/Carbenicillin^R verleiht und das die Levansucrase kodierende Gen *sacB*.

Wird der Vektor p Δ pcpS zum Knockout von *PA1165* in *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt, so sind zwei Szenarien möglich. Es kann entweder zum Singlecrossover kommen, d.h. das gesamte Plasmid wird in das Genom von *P. aeruginosa* integriert, oder aber zu einem Doppelcrossover, bei dem *PA1165* durch die vektorkodierte Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt wird. Findet ein Singlecrossover statt, so sollten diese Kolonien Gentamycin und Ampicillin/Carbenicillin resistent sein und auf sucrosehaltigem Medium absterben. Bei einem Doppelcrossover Ereignis sollten die gentamycinresitenten Kolonien jedoch bei Gegenselektion auf sucrosehaltigem Medium normales Wachstum zeigen.

M. Schobert nutzte die Oligonukleotide 5'-atagaattcggttgagcccgatcttgc-3' und 5'-ataaagcttcttgcctggccgaatgg-3', um mittels PCR das Wildtyp *PA1165* Gen oder das durch die Gentamycinkassette unterbrochene Gen nachzuweisen. Mit diesen Oligonukleotiden wurde in beiden Fällen ein jeweils ca. 3 kb großes Fragment amplifiziert. Restriktionsverdau mit *AgeI* liefert im Falle des Wildtyp Gens zwei 1.5 kb Fragmente, wohingegen Verdau mit *SpeI* ein 1

kb und ein 2 kb Fragment liefert, das die Anwesenheit der Gentamycinkassette in diesem Fragment nachweist.

Die Integrität des Vektors kann auch in *E. coli* überprüft werden. Bevor der Vektor von M. Schobert (AG Prof. Dr. D. Jahn, TU Braunschweig) in *Pseudomonas aeruginosa* zur Deletion von *PA1165* nach bekanntem Protokoll (143) eingesetzt wurde, wurde *E. coli* XL10Gold damit transformiert und auf LB-Medium mit 5% (w/v) Sucrose ausplattiert. Zur Kontrolle wurde derselbe *E. coli* Stamm mit pQE30[*acpS*] transformiert und auf dieselbe Platte ausgestrichen.

4.2 Proteintechniken

4.2.1 Genexpression

Zur heterologen Genexpression kam hauptsächlich das pQE-Expressionssystem von Qiagen (Hilden) zum Einsatz. Für die Produktion der A-Domänen TycC6-A und GrsA-A wurde das pASKIBA-System der Firma IBA (Göttingen) verwendet. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* M15 oder BL21 (XL10Gold im Falle des IBA Systems) durch Elektroporation mit den Expressionsplasmiden transformiert. *E. coli* M15 enthält das Helferplasmid pREP4, dessen *lacI* für eine effiziente Unterdrückung der Expression in Abwesenheit von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) sorgt.

4.2.1.1 Expression im pQE-Vektorsystem

5 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden Expressionsstamms in LB Medium wurde in 500 mL desselben Mediums inokuliert. Die Produktionskultur wurde bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer A_{600} von 0.5-0.7 inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Produktionskultur wurde weitere 2-5 h bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 500 g und 4 °C geerntet; das Zellpellet wurde anschließend in Puffer Hepes-A (50 mM Hepes, 300 mM NaCl (pH 8.0)) resuspendiert. Entweder wurde das Rohzelleextrakt sofort präpariert oder die resuspendierten Zellen wurden bis dahin bei -20 °C eingefroren.

4.2.1.2 Expression im IBA-Vektorsystem

In Abweichung zu 4.2.1.1 wurde hier 1 mL einer Übernachtskultur des XL10Gold Expressionsstamms in LB in 100 mL desselben Mediums inokuliert. Die Produktionskultur wurde bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte mit 5 µL einer 2 mg/mL Anhydrotetracyclinlösung in Dimethylformid bei einer A_{600} von 0.5. Die Produktionskultur wurde noch weiter 3 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, bevor die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben geerntet wurden. Das Zellpellet wurde in 1.5 mL Puffer W (100 mM Tris/HCL, 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (pH 8.0)) resuspendiert und bis zur Präparation des Rohzellextrakts bei -20 °C eingefroren.

4.2.2 Präparation von Rohzellextrakten

Die Präparation von Rohzellextrakten erfolgte durch drei Durchläufe einer auf 0 °C gekühlten 40 K French Press[®] Zelle (SLM Aminco, Urbana, Illinois (USA)). Der große Druckunterschied zwischen dem Inneren der Zelle (ca. 1100 *pounds per square inch* (psi), 18 MPa) und der Umgebung bewirkt ein Zerreißen der Zellwände. Das resultierende Rohzellextrakt wurde 30 min bei 36 000 g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellüberstand zu trennen.

4.2.3 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung erfolgte entweder durch Ni^{2+} -Nitrilotriacetat (NTA) Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen, durch Streptactin Affinitätschromatographie oder durch Verwendung von Hydrophober Interaktions- (HIC), Ionentauscher- (IEX) und Gelfiltrationschromatographie (GFC).

4.2.3.1 Proteinreinigung mittels Ni^{2+} -NTA

Die Reinigung von Proteinen mittels Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie erfolgte im wesentlichen wie zuvor beschrieben (39). Normalerweise wurden Zellen aus einer 500 mL – 1 L Expression auf einmal auf eine 2 cm Säule bestehend aus Ni^{2+} -NTA Superflow (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Als Leersäule diente eine HR 10/2 (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Auftragung erfolgte mit 3% Hepes-B (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8.0)) bei 1 mL/min. Dazu wurde ein *fast protein liquid chromatopgraphy* (FPLC) System (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet und die Säule wurde zuvor mit 10

Säulenvolumina (*column volumes*, CV) 3% Hepes-B äquilibriert. Nicht gebundene Proteine wurden mit 3% Hepes-B bei 3 mL/min von der Säule gewaschen, die A_{220} wurde verfolgt. Hatte die A_{220} wieder den Ausgangswert erreicht, wurde ein 30 mL linearer Gradient auf 50% Hepes-B angelegt gefolgt von einem 10 mL linearen Gradienten auf 100 % Hepes-B mit einer Flussrate von 2 mL/min. Während der Gradienten wurden 2 mL Fraktionen gesammelt. Das Vorkommen von Proteinen in den Fraktionen wurde durch denaturierende SDS-PAGE verifiziert (15 % Lämmli Gele). Im Falle von PcpS wurde den Puffern 30% Glycerol (v/v) beigemischt.

Zur weiteren Reinigung wurden die Protein üblicherweise noch einer GFC unter Benutzung einer 26/60 Superdex 75 (Amersham Biosciences, Freiburg) unterzogen. Im Falle aller CP wurde dazu Puffer GFC-A (50 mM Tris/HCl (pH 7.0)) verwendet. Im Fall von PcpS wurde Puffer GFC-B (75 mM MES/Na Acetat, 30% Glycerol (v/v) (pH 6.5)) verwendet. War eine weitere Reinigung nicht notwendig wurden die Proteine mittels HiTrap[®] Desalting Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) gegen GFC-A bei 5 mL/min entsalzt. *B. subtilis* Sfp wurde wie zuvor beschrieben gereinigt (82). Anschließend wurde die Proteinlösung auf 20% Glycerol (v/v) eingestellt und bei -80 °C gelagert.

4.2.3.2 Proteinreinigung mittels Streptactin Affinitätssäulen

Resuspendierte Zellen wurden wie oben beschrieben aufgeschlossen und der Überstand der Zentrifugation wurde auf eine 1 mL Streptactin *gravity flow* Säule (IBA, Göttingen) aufgetragen, die mit 2 x 2.5 mL Puffer W äquilibriert worden war. Nachdem die Probe vollständig in die Matrix eingedrungen war wurden nicht gebundene Proteine mit 5 x 1 mL Puffer W von der Säule gewaschen. Das Protein wurde anschließend mit 6 x 0.5 mL Puffer E (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM Desthiobiotin (pH 8.0)) eluiert, wobei 0.5 mL Fraktionen genommen wurden. Die Säule wurde mit 5 mL Puffer R (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM 4'-Hydroxy-benzolazo-2-benzoesäure (HABA) (pH 8.0)) gefolgt von Waschen der Säule mit 4 mL Puffer W regeneriert. Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Entsalzung erfolgte wie unter 4.2.3.1 beschrieben.

4.2.3.3 Reinigung ungetagter Proteine

Zur Reinigung von Proteinen, die nicht mit einem Tag fusioniert waren (AcpS sowie seine Mutanten) wurde eine Reinigungsstrategie unter Verwendung von HIC, IEX und GFC entwickelt. Nach der Expression in *E. coli* wurden das Zellpellet vor dem Zellaufschluß in

Puffer GFC-C (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 20% Glycerol (v/v) (pH 7.0)) resuspendiert. Nach dem Zentrifugationsschritt zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde der klare Überstand mit GFC-C bei einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit 2 CV äquilibrierte 26/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die isokratische Elution erfolgte mit GFC-C bei einer Flussrate von 1 mL/min. Dabei wurden 4 mL-Fraktionen gesammelt. Das Vorhandensein der AcpS-Mutanten in den Fraktionen wurde durch SDS-PAGE verifiziert und anschließend wurde die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Die vereinigten Fraktionen der ersten GFC wurden auf einen 6 mL Resource[®] 15S Kationentauscher (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Der Kationentauscher wurde zuvor mit GFC-C bei 5 mL/min äquilibriert; aufgetragen wurde mit dem selben Puffer bei der selben Flussrate. Nichtgebundene Proteine wurden mit 5 CV GFC-C heruntergewaschen bevor zur Elution ein 120 mL linearer Gradient auf 100% Puffer CEX (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 500 mM NaCl (pH 7.0)) angelegt wurde. Die Flussrate betrug 5 mL/min, 2 mL Fraktionen wurden gesammelt. Diejenigen Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten wurden vereinigt und mit Ultrafiltration (Vivaspin, 10 kDa *molecular weight cut off* (MWCO)) (Vivascience AG, Hannover) bei 2 800 g ankonzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine mit 2 CV Puffer GFC-D (50 mM Tris/HCl, 20% Glycerol (pH 8.8)) äquilibrierte 16/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 0.75 mL/min aufgetragen. Die isokratische Elution erfolgte mit GFC-D bei 0.75 mL/min, die Fraktionsgröße betrug 2 mL. Die Fraktionen, die gewünschte AcpS Mutante enthielten wurden vereinigt und bei -80 °C gelagert. *B. subtilis* AcpS wurde wie zuvor beschrieben gereinigt (92).

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch Messung der A_{280} bestimmt und aufgrund des theoretischen Extinktionskoeffizienten auf die Konzentration zurückgerechnet. Dazu wurde die gleiche 200 μL , 1 cm Quartzküvette zum Nullabgleich gegen Puffer und Messung der Extinktion verwendet. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm Protean (DNASTAR Inc., Madison, WI (USA)) berechnet und waren wie folgt:

Tabelle 12: Theoretische Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

Protein	Theoretischer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
AcpS	6 520
Sfp-His ₆	27 220
B.s.-ACP-His ₆	1 280
DCP-His ₆	5 810
AcpK-His ₆	1 400
alle AcpS-Mutanten	6 520
TycC3-PCP-His ₆	9 530
hPCP-His ₆	9 530
PcpS-His ₆	38 220
P.a.-ACP-His ₆	1 280
pchE-ArCP-His ₆	13 020

Aus Übersichtlichkeitsgründen wird im Folgenden die Bezeichnung –His₆ weggelassen.

4.2.5 Größenbestimmung von PcpS

Zur Bestimmung der Größe und eventuellen Aggregationszustands eines Proteins kann eine kalibrierte Gelfiltrationssäule verwendet werden. Im Fall von PcpS wurde eine 26/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) mit einem Äkta Purifier System (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Diese Säule wurde mit 2 CV Puffer GFC-A äquilibriert und anschließend mit folgenden Proteinen kalibriert (die Zahlen in Klammern geben die Größe des Proteins sowie die eingesetzte Menge an): Aprotinin (6.5 kDa, 3 mg), Cytochrom c (12.4 kDa, 2 mg), Carboanhydrase (29 kDa, 2 mg) und Ei-Albumin (45 kDa, 5 mg). Das Todvolumen der Säule wurde in einem separaten Lauf mit Ferritin (450 kDa, 5 mg) bestimmt. Die Isokratische Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 1 mL/min mit GFC-A, die A_{220} wurde aufgezeichnet. Die Retentionszeiten (V) der Proteine waren wie folgt: Aprotinin: 247.14 mL, Cytochrom c: 214.97 mL, Carboanhydrase: 186.21 mL, Ei-Albumin: 163.15 mL, Ferritin: 108.96 mL (V_0). Das V/V_0 -Verhältnis der Proteine wurde gegen ihre Größe in $\log(\text{kDa})$ aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet. 5 mg des PcpS wurden auf die gleiche Säule aufgetragen und ebenso eluiert. Die Retentionszeit des PcpS war 185.67 mL.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Radioaktivassay zur Bestimmung der PPTasenaktivität

Die Aktivität der PPTasen wurde durch eine Radioaktivmethode bestimmt, die in Anlehnung an die Methode von Lambalot *et al.* (72) entwickelt wurde. Diese Methode misst den Einbau der [³H]-markiertem 4'PP-Gruppe von [³H]CoA in *apo*-CP. Die 100 µL Reaktionsansätze enthielten 50 mM Tris/HCl (pH 8.8) (75 mM MES/NaAc (pH 6.0) im Fall von Sfp und (pH 6.5) im Fall von PcpS), 12.5 mM MgCl₂, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 6-100 µM CP, 2-20 µM CoA, 119-475 nM [³H]CoA (mit der spezifischen Aktivität 40 Ci/mmol, 0.95 mCi/mL) und 2.2 nM-1 µM AcpS, 1 µM der AcpS Mutanten, 25-800 nM Sfp oder 120 nM PcpS. Die Reaktion wurde durch Zugabe der PPTase gestartet und bei 37 °C 5-30 min oder 18 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.8 mL eiskalter 10% (v/v) Trichloressigsäure (TCA) beendet und zugleich die Proteine präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation bei 16 000 g in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde dann zwei mal mit 0.8 mL 10% TCA (v/v) gewaschen und schließlich in 200 µL Ameisensäure gelöst. Die Proteinlösung wurde mit 3.5 mL Rotiszint Eco Plus Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) gemischt und die Radioaktivität der Probe mit einem 1900CA Tri-Carb *liquid scintillation analyzer* (Packard, Dreieich) bestimmt.

4.3.2 HPLC Methoden zur Bestimmung kinetischer Größen

Für kinetische Studien wurde die Menge an gebildetem *holo*-CP mit einer HPLC Methode bestimmt. Diese Methode ist an eine zuvor beschriebene, allerdings präparative Methode, angelehnt (71). Die im Folgenden beschriebenen Daten wurden mindestens doppelt bestimmt.

Zur Bestimmung von K_m und k_{cat} -Werten von AcpS enthielten die 800 µL Reaktionsmischungen 50 mM Tris/HCl (pH 8.8), 12.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2-200 µM *apo*-B.s.-ACP (*apo/holo*-Mischung, wie im Fall aller CP), 2-60 µM *apo*-AcpK, 5-135 µM *apo*-hPCP oder 1-150 µM *apo*-DCP, 500-1000 µM CoA und 5.6-11.2 nM AcpS oder 5-508 nM der AcpS Mutanten. Im Fall von Sfp waren 800 µL Reaktionsmischungen folgendermaßen zusammengesetzt: 75 mM MES/NaAc (pH 6.0), 12.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2-200 µM *apo*-B.s.-ACP, 2-60 µM *apo*-AcpK 1-102 µM *apo*-DCP, 500 µM CoA und 10 nM Sfp. Für kinetische Studien an PcpS wurden 800 µL Reaktionsansätze mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 75 mM MES/NaAc (pH 6.5), 1.5-250 µM *apo*-P.a.-ACP, 2.2-200 µM *apo*-B.s.-ACP, 1-154 µM *apo*-PchE-ArCP oder 0.9-150 µM *apo*-TycC3-PCP., 10

mM MgCl₂, 1-500 µM CoA und 15-34.3 nM PcpS. Zu Inhibitorstudien an PcpS wurden 7 µM *apo*-P.a.-ACP, 5 µM CoA, 5 µM MADP, 12.5 mM MgCl₂, 686 nM PcpS sowie 75 mM MES/NaAc (pH 6.5) eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 17 min bei 37 °C inkubiert.

In allen Fällen wurden die Reaktionsansätze ohne PPTase 10-15 min bei 37 °C präinkubiert, anschließend die Reaktion durch Zugabe der PPTase gestartet und 5-30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10% TCA (v/v) Endkonzentration beendet und die Protein präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 16 000 g für 30 min in einer Tischzentrifuge pelletiert und anschließend in 120 µL 1 M Tris/HCl (pH 8.8) gelöst. Eine 3-100 µL Probe der resuspendierten Proteine wurde anschließend auf eine analytische Nucleosil® 250/5 120/3 C₁₈-reversed phase Säule (MachereyNagel, Düren) aufgetragen, die zuvor mit 95% HPLC-A (0.1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in ddH₂O) äquilibriert worden war. Im Fall von B.s.-ACP und hPCP wurde zunächst ein 1.2 mL linearer Gradient auf 60% HPLC-B (Methanol in 0.1% (v/v) TFA) angelegt, gefolgt von einem 7.2 mL linearen Gradienten auf 95% HPLC-B bei einer Flussrate von 0.3 mL/min und 40 °C Säulentemperatur. Für AcpK wurde ein 15 mL linearer Gradient auf 80 % HPLC-C (Isopropanol in 0.1% TFA (v/v)) gefolgt von einem 0.6 mL linearen Gradienten auf 95% HPLC-C angelegt bei 0.3 mL Flussrate und 40 °C Säulentemperatur. Im Fall von TycC3-PCP wurde die Säule mit 60% HPLC-A äquilibriert und nach dem Probenaufrag ein 15 mL linearer Gradient 40-95% HPLC-D (Acetonitril in 0.1% (v/v) TFA) angelegt bei einer Flussrate von 0.5 mL/min und 40 °C Säulentemperatur. Für P.a.-ACP, PchE-ArCP und DCP wurde die Säule mit 95% HPLC-A äquilibriert und dann ein 24.3 mL linearer Gradient auf 95% HPLC-D (auf 60% HPLC-D im Fall von PchE-ArCP) angelegt bei einer Flussrate von 0.9 mL/min und einer Säulentemperatur von 45 °C.

In allen Fällen wurde die A₂₂₀ aufgezeichnet. Unter den genannten Bedingungen eluiert das *holo*-CP vor dem *apo*-CP. Die Retentionszeiten der verschiedenen *holo*- und *apo*-CP war wie folgt:

Tabelle 13: Retentionszeiten der verschiedenen CP

Protein	Retentionszeit <i>holo</i>-Form [min]	Retentionszeit <i>apo</i>-Form [min]
B.s.-ACP	24.3	25.2
AcpK	53.9	54.8
hPCP	26.1	27.7
TycC3- PCP	10.52	12.15
P.a.-ACP	18.74	20.53
PchE-ArCP	24.13	24.84
DCP	23.51	25.06

Die Menge des gebildeten *holo*-CP wurde Division der Signalfläche des *holo*-CP durch die Summe der Signalflächen von *holo*-CP und *apo*-CP errechnet. Davon wurde schließlich noch die Menge an *holo*-CP abgezogen, die nach der heterologen Produktion des CP in *E. coli* schon vorhanden war.

Zur Bestimmung des K_m -Werts von PcpS für CoA wurde die Konzentration von CoA zwischen 1 und 500 μM variiert, während die Konzentration von P.a.-ACP bei 200 μM konstant gehalten wurde. Um den optimalen pH für die PPTase-Aktivität von PcpS zu bestimmen wurden Puffer MES/NaAc (für pH 4.5-6.5) und Tris/HCl (für pH 7.0-9.0) in einer Konzentration von 75 μM eingesetzt.

Die so erhaltenen Geschwindigkeits-/Konzentrationswertepaare wurden gegeneinander aufgetragen und anschließend eine Gleichung vom Michaelis-Menten-Typ angepasst.

4.3.3 ATP/PP_i-Austausch

Zur Bestimmung der A-Domänen Aktivität hinsichtlich der Aktivierung der AS wurde der ATP/PP_i-Austausch durchgeführt. Dieser Assay misst die Rückreaktion der A-Domänen katalysierten Adenylatbildung (s. Einleitung), durch die aus dem AS-AMP und PP_i erneut ATP gebildet wird. Der Einsatz von [³²P]PP_i in diesem Assay bewirkt einen Einbau von [³²P] in ATP, der in direkter Korrelation zur A-Domänenaktivität steht.

Reaktionsansätze (100 μL) enthielten 200 nM Enzym, 0.5 mM AS, 2 mM dATP oder ATP, 0.05 mM PP_i, 10 mM MgCl₂, 0.15 μCi [³²P]PP_i in Puffer W. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet, 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 500 μL eiskalten Terminationsmix (100 mM Natriumpyrophosphat, 560 nM Perchlorsäure,

1.2% (w/v) Aktivkohle (Norit A)) beendet. Die Reaktionsansätze wurden vortexiert und die Aktivkohle durch Zentrifugation bei 16 000 g für 1 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. In diesem Schritt bindet die Aktivkohle das ATP, so dass sich die Radioaktivität anschließend im Pellet befindet. Das Pellet wurde zwei mal mit 1 mL Wasser gewaschen und schließlich in 500 µL Wasser resuspendiert. Die resuspendierte Aktivkohle wurde mit 3.5 mL Rotiszint Eco Plus Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) gemischt und mit einem 1900CA Tri-Carb *liquid scintillation analyzer* (Packard, Dreieich) analysiert.

Zur Bestimmung der Funktionalität der Linker-modifizierten Inhibitoren wurden GrsA-A Inhibitoren 5'-O-[N-(phenylalanyl)-sulfamoyl] adenosin **1** und 2'-O-[polyether-biotin]-5'-O-[N-(phenylalanyl)-sulfamoyl] Adenosin **5** im ATP/PP_i-Austausch in den Konzentrationen 2-100 nM, die SrfA-C-A Inhibitoren 5'-O-[N-(leucyl)-sulfamoyl] Adenosin **2**, 2'-O-[polyether]-5'-O-[N-(leucyl)-sulfamoyl] Adenosin **3** und 3'-O-[polyether]-5'-O-[N-(leucyl)-sulfamoyl]-2'-desoxy Adenosin **4** in den Konzentrationen 10 und 30 nM in einem Assay in Anlehnung an (85) eingesetzt. Im Assay wurden zunächst 200 nM Enzym, 10 µM AS und die entsprechende Menge Inhibitor in 50 µL Puffer W 1 min bei 37 °C präinkubiert, bevor die restlichen Komponenten (s.o.) in 50 µL Puffer W (auf Eis) zugegeben wurden. Die Reaktion wurde genau 1 min bei 37 °C inkubiert und dann durch Zugabe des Terminationsmixes gestoppt. Das Aktivkohlepellet wurde dreimal statt zweimal mit Wasser gewaschen.

4.3.4 Aminoacylierung von B.s.-ACP und DCP

Nachdem die A-Domäne das AS-Substrat als Acyladenylat aktiviert hat, belädt sie damit den 4'PP-Arm des CPs. Diese Beladungsreaktion kann mit Hilfe einer radioaktiv markierten AS verfolgt werden. Da es sich bei DltA und DCP um einzelständige Proteine handelt, konnten hier zum ersten mal auch kinetische Größen bestimmt werden. Dazu wurde die Konzentration von DCP oder B.s.-ACP variiert, während die D-Ala Konzentration konstant gehalten wurde. Reaktionsansätze (in Doppelbestimmung) enthielten 0.12-10.05 µM *holo*-DCP oder 0.19-119.5 µM *holo*-B.s.-ACP, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP und 130 µM [¹⁴C]D-Ala (55 mCi/mmol, 100 µCi/mL) in 50 µL Beladungspuffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) und wurden bei 37 °C 2 min lang präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 nM DltA (600 nM im Fall von B.s.-ACP) in 37 °C warmem Beladungspuffer gestartet und die Reaktionsansätze wurden eine weitere min (2 min im Fall von ACP) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 800 µL eiskalter 10% (v/v) TCA. Als Fällungshilfe wurden noch 15 µL einer Rinderserumalbumin

(BSA) Lösung (25 mg/mL) zugegeben und die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 16 000 g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Das Proteinpellet wurde zweimal mit je 1 mL eiskalter 10% (v/v) TCA gewaschen und anschließend in 180 µL Ameisensäure gelöst. Diese Proteinlösung wurde mit 3.5 mL Rotiszint Eco Plus Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) gemischt und mit einem 1900CA Tri-Carb *liquid scintillation analyzer* (Packard, Dreieich) analysiert.

4.3.5 Inhibierung von DltA *in vivo*

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *dltA* Mutanten anderer Bakterienstämme auf Vancomycin empfindlicher reagieren (124). Um zu bestimmen, ob der D-Ala-Sulfamoyl-Adenylat Inhibitor den antibiotischen Effekt von Vancomycin auf *B. subtilis* verstärkt, wurde eine Assay auf Festmediumplatten durchgeführt. Als Stämme dienten *B. subtilis* JH642, sowie JH642Δ*dltA*. 800 µL einer Übernachtskultur dieser Stämme in LB-Medium wurde mit dem gleichen Volumen *Softagar* (LB-Medium, 0.5% (m/v) Agar) gemischt und auf eine LB-Festmediumplatte gegossen. Diese Platten wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um sie zu trocknen. Anschließend wurden Whatmanpapierscheiben mit 5 mm Durchmesser auf die getrockneten Platten gelegt. Auf diese Scheiben wurden die im Folgenden beschriebenen Lösungen aufgetragen. Zunächst wurden entweder 1-200 µL einer 10 mg/mL Vancomycinlösung oder 0.5-10 µL einer 50 mg/mL Ampicillinlösung aufgetropft. In einem weiteren Test wurden entweder 10 oder 50 µL des Inhibitors (10 mM) und gleichzeitig 1-50 µL Vancomycin (10 mg/mL) aufgetropft, um den Effekt des Inhibitors in Kombination mit Vancomycin zu untersuchen.

Die Festmediumplatten wurden 20 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Durchmesser des Hemmhofes gemessen und gegen die Vancomycin bzw. Ampicillinkonzentration aufgetragen.

4.3.5 Bestimmung der Luciferaseaktivität *in vivo* und *in vitro*

Die *Photinus pyralis* Luciferase katalysiert die Aktivierung von Luciferin als Luciferyl-AMP identisch der AS-Aktivierung durch die A-Domäne. Dieses Zwischenprodukt wird dann von Luftsauerstoff unter Lichtabgabe zu Oxyluciferin oxidiert (Abb. 19) (163). Die Lichtabgabe erfolgt, pH abhängig, im sichtbaren Bereich zwischen 565-617 nm (164) und kann mit dem bloßen Auge beobachtet werden.

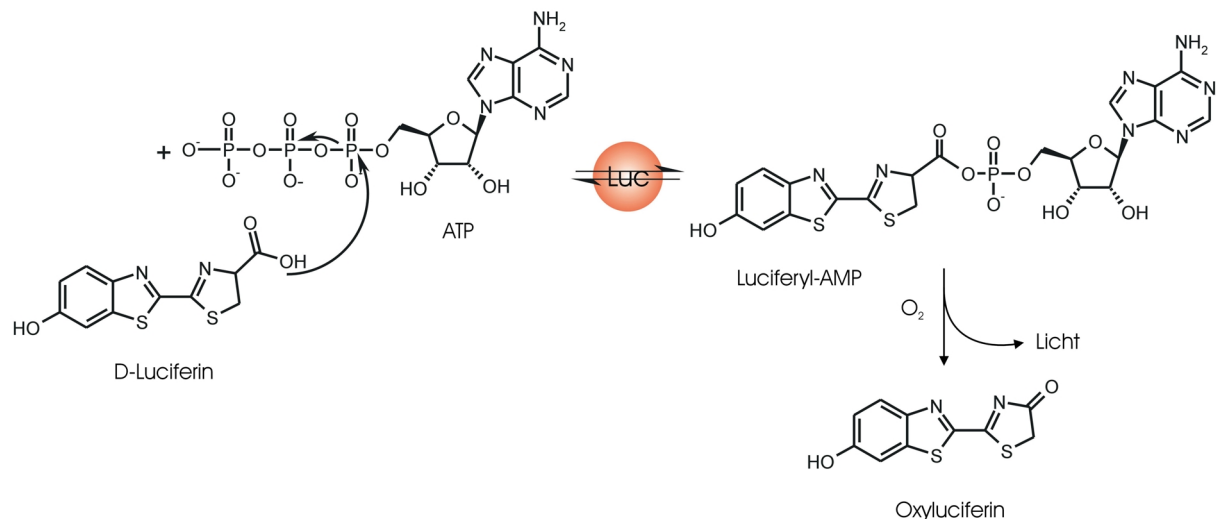


Abb. 19: Die Luciferase-katalysierte Aktivierung von D-Luciferin. Die Luciferase aktiviert D-Luciferin in einer Reaktion identisch der, die von A-Domänen katalysiert wird. Das Zwischenprodukt Luciferyl-AMP wird durch Luftsauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert, wobei Licht abgegeben wird.

Dieser Effekt kann aber auch in *E. coli* ausgenutzt werden, um leuchtende Kolonien zu erzeugen (165). Um diesen Effekt zur *in vivo* Analyse der Luciferaseaktivität auszunutzen wurde *E. coli* M15 mit pQE60[luc] transformiert und in LB Medium 45 min bei 37 °C inkubiert. Eine 0.45 µm Nitrocellulosemembran (Millipore, Mohlsheim) wurde auf eine LB-Festmediumplatte mit den Zusätzen 100 µg/mL Ampicillin, 15 µg/mL Kanamycin, 1 mM IPTG gelegt und angedrückt. Anschließend wurde der genannte *E. coli* M15-pQE60[luc] darauf ausgestrichen und so lange bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden (ca. 24 h). Die Nitrocellulosemembran wurde dann von der Platte abgezogen und in eine frische Petrischale mit 800 µL Luciferinlösung (1 mM Luciferin, 100 mM Na-Citrat (pH 5.0)) gelegt. Diese Petrischale wurde 10 min lang im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend konnten die leuchtenden *E. coli* Kolonien im Dunkeln beobachtet werden. Alternativ wurde die Nitrocellulosemembran verkehrt herum auf eine klare Plastikfolie gelegt. Diese Kombination wurde anschließend 2-30 min auf photographischen Film Biomaxx MR (Kodak, Rochester (USA)) gelegt.

Um eine quantitative Aussage treffen zu können wurden 125 µL Reaktionsansätze (im Doppel) hergestellt, die 160 µM Luciferin, 300 nM der gereinigten Luciferase, 8 µM ATP und Puffer 100 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA (pH 8.0) enthielten. Kontrollen enthielten entweder kein Luciferin oder keine Luciferase. Diese Reaktionsmischungen wurden in eine 96-well/200 µL pro Well Mikrotiterplatte pipettiert und im Mikrotiterplattenlesegerät Victor² (Perkin Elmer, Schwalbach) 30 s bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Lumineszenz zwischen 1-30 s gemessen.

5. Ergebnisse

Im Ergebnisteil werden zunächst die Untersuchungen zur 4'-Phosphopantetheinylierungsreaktion in *B. subtilis* vorgestellt. *B. subtilis* unterhält sowohl im Primär- wie auch im Sekundärstoffwechsel CP-abhängige Stoffwechselwege. Daher war zunächst die Frage zu klären, ob die PPTasen in *B. subtilis*, wie in *E. coli*, hinsichtlich ihrer Selektivitäten für CP des Primär- und Sekundärstoffwechsels diskriminieren. In *E. coli* ist die PPTase des Primärstoffwechsels, AcpS, lediglich für die Modifikation des FAS ACP zuständig, während EntD nur CP des Enterobactinsystems modifiziert (70). Dasselbe Szenario ist auch in *B. subtilis* mit seinen zwei PPTasen, AcpS und Sfp, denkbar und sollte daher untersucht werden. Außerdem wird die Frage behandelt, ob die Erkenntnisse aus der Kristallstruktur des AcpS-ACP-Komplexes sich dazu ausnutzen lassen ein neues CP zu kreieren, das universellen Charakter hinsichtlich der Modifikation durch AcpS und Sfp hat. Trotz der sehr unterschiedlichen Strukturen der AcpS- und Sfp-Typ PPTasen katalysieren die PPTasen die gleiche Reaktion. Da die ACP-Bindestelle in AcpS durch die Kristallstruktur bekannt war, lag es nahe, die beiden PPTasen hinsichtlich ihrer Verwandtschaft zu untersuchen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse über Sfp sollten dazu genutzt werden, das Spezifitätsspektrum von AcpS zu erweitern.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der ungewöhnlichen Situation in *P. aeruginosa*, der lediglich eine PPTase des Sfp-Typs besitzt. Diese PPTase muss folglich alle CP des Bakteriums bedienen und ein breites Spezifitätsspektrum aufweisen. Zu Beginn der in diesem Teil vorgestellten Ergebnisse bekannt war, dass eine *B. subtilis* *acpS*-Deletionsmutante durchaus mit der Sfp-Typ PPTase als einzige PPTase auskommen kann, ohne dabei eine Aberration im Phänotyp zu zeigen. Es stellte sich daher die Frage, ob die Situation in *P. aeruginosa* nur das Ergebnis des Verlusts einer AcpS-Typ PPTase darstellt.

Der letzte Teil der vorliegenden Arbeit behandelt schließlich die Inhibierung und Vorbereitung von A-Domänen zur gerichteten Proteinevolution. Dazu wurden die von A. Neumüller begonnene Untersuchungen fortgeführt und die daraus gewonnenen Erkenntnisse auf neue Anwendungsgebiete ausgedehnt.

5.1 Phosphopantetheintransfer in *B. subtilis*

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit ist *B. subtilis* AcpS schon hinsichtlich seiner katalytischen Eigenschaften mit dem kognaten FAS ACP sowie mit CoA charakterisiert worden. Die Michaelis-Konstanten für Sfp, der PPTase des Sekundärmetabolismus in *B. subtilis*, für CoA sowie für einige kognate PCP-Substrate und *E. coli* FAS ACP waren ebenfalls bekannt (23). Dies lies allerdings keine Aussage über den Spezialisierungsgrad der beiden PPTasen hinsichtlich der 40 verschiedenen Typ I (eingebetteten) sowie 2 Typ II (einzelständigen) CP in *B. subtilis* zu (Abb. 20). Um dies näher zu untersuchen, habe ich zur Charakterisierung neben dem FAS ACP das TycC3-PCP sowie *B. subtilis* DCP verwendet. Neue Erkenntnisse von Mootz *et al.* zeigten einen bisher unbekannte ORF im *B. subtilis* Genom, der bisher im Genomprojekt nicht annotiert war (94). Es handelt sich um ein Gen, das für ein weiteres, ACP-ähnliches CP (82 AS, 9.25 kDa, pI 4.2) codiert, und sich mit ORF *pksF* überschneidet. Das putative Gen wurde aufgrund der Ähnlichkeit des *pksX* Clusters zu FAS und PKS des Typ I, *acpK* genannt (Abb. 20). Das Genprodukt, AcpK, wurde ebenfalls zur Charakterisierung von AcpS und Sfp herangezogen. Zu diesem Zweck war es notwendig, die entsprechend klonierten Gene in *E. coli* heterolog zu exprimieren und die CP in ausreichenden Mengen für eine biochemische Charakterisierung als Substrat einer PPTase zu produzieren. Neben dem unter 4.3.1 beschriebenen, qualitativen Assay musste auch jeweils eine Methode entwickelt werden, die es ermöglichte, die *apo*- und *holo*-Form der CP auf einer *reversed phase* HPLC-Säule zu trennen, um den 4'PP-Transfer quantifizieren zu können.

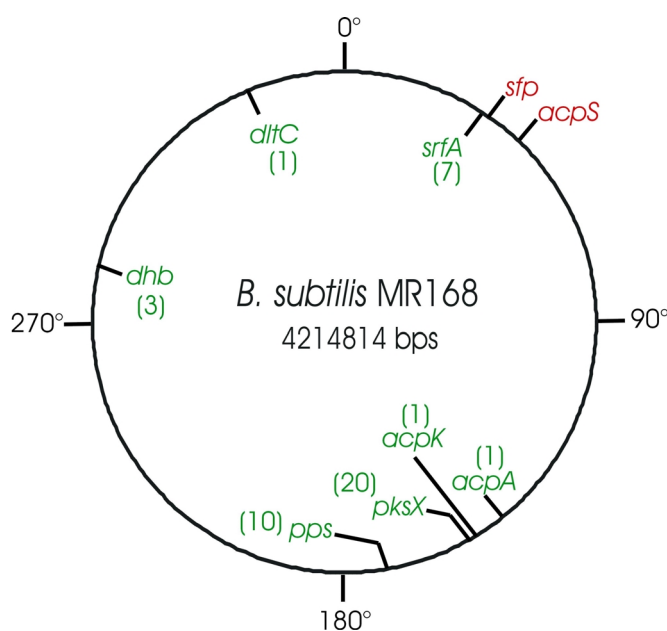


Abb. 20: Genkarte des *B. subtilis* MR168 Genoms. Gezeigt sind die relevanten Genloki. Gene, die für PPTasen (*sfp* und *acpS* in rot) kodieren befinden sich außerhalb des Kreises. Gene und Gencluster, die für CP kodieren (grün) sind innerhalb des Kreises. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der CP im jeweiligen Cluster an.

5.1.1 Produktion und Reinigung der Proteine

Alle CP, die für die Charakterisierung von AcpS und Sfp eingesetzt wurden, sind in *E. coli* heterolog als C-terminale His₆-Fusionsproteine produziert und mittels Ni²⁺-NTA Chromatographie gefolgt von Gelfiltrationschromatographie gereinigt worden. AcpS und Sfp wurde produziert und gereinigt, wie zuvor beschrieben (82,92). Die Analyse der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE (Abb. 21) zeigte zwei Banden im Fall von ACP, vermutlich eine für *apo*- und eine für das *holo*-ACP Dimer. Dies deutet auf eine teilweise *apo*- zu *holo*-Umwandlung des CP während der heterologen Expression durch eine *E. coli* PPTase hin. Der von Keating *et al.* beschriebene Effekt einer Wachstumshemmung in *E. coli* durch nicht modifiziertes (*apo*)-ACP konnte von uns in *B. subtilis* nicht beobachtet werden (166).

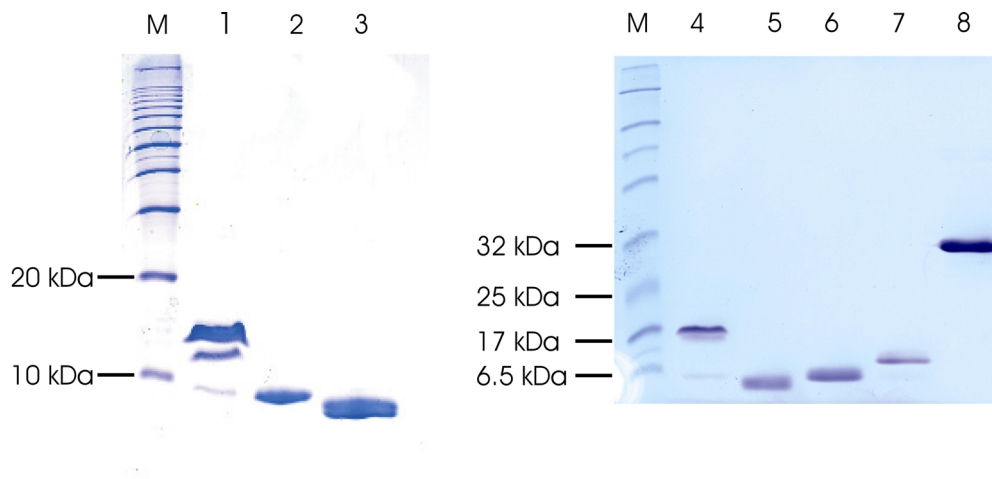


Abb. 21: SDS-PAGE Analyse, gefärbt mit Coomassie Brilliant blue, der Reinigung von 1. B.s.-ACP, 2. AcpK, 3. DCP, 4. B.s.-ACP, 5. DCP, 6. TycC3-PCP, 7. AcpS, 8. Sfp und M: Proteinmarker.

Nach Abschätzung durch SDS-PAGE konnten alle Proteine in Reinheiten >99% erhalten werden. Die Ausbeuten beliefen sich auf 40 mg B.s.-ACP, 22 mg TycC3-PCP, 4.5 mg AcpK, 30 mg DCP, 5 mg AcpS und 10 mg Sfp pro Liter Zellkultur.

5.1.2 Proteinpartner von AcpS und Sfp

In einem qualitativen Radioaktivassay wurde zunächst untersucht, welche der CP als Substrate für die beiden PPTasen in Frage kommen. In diesem Assay wird der Transfer von [³H]-markiertem 4'PP von CoA auf das CP gemessen. Vor den Versuchen war schon bekannt, dass AcpS das FAS ACP mit hoher Effizienz modifiziert. Ebenso konnte schon zuvor die breite Substrattoleranz von Sfp mit heterologen CP gezeigt werden. Die gemessenen Daten (Abb. 22) zeigen, dass sich diese hohe Substrattoleranz nicht nur auf diese CP beschränkt, obwohl ein höherer Spezialisierungsgrad für die homologen CP vorstellbar gewesen wäre.

Abb. 22 zeigt, dass die entbehrliche PPTase Sfp alle getesteten CP, insbesondere auch das FAS ACP, erkennt und modifiziert.

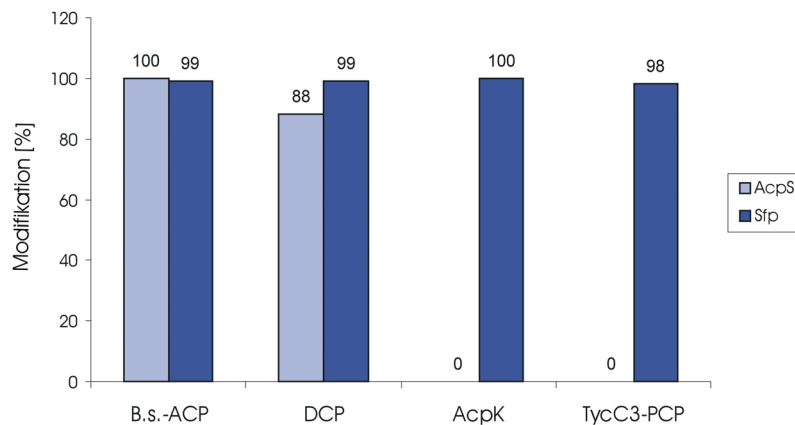


Abb. 22: Proteinpartner von AcpS und Sfp. Die verschiedenen CP (6 μM) wurden mit [^3H]CoA und AcpS (0.22 μM) oder Sfp (0.8 μM) 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Gezeigt ist die Modifikation der CP in Prozent durch AcpS (hellblau) und Sfp (dunkelblau). Sfp erkennt und modifiziert alle getesteten CP, während AcpS nur B.s.-ACP und DCP des Primärmetabolismus modifiziert, die CP des Sekundärmetabolismus, AcpK und TycC3-PCP jedoch nicht.

AcpS hingegen erkennt lediglich die CP des Primärmetabolismus, nämlich B.s.-ACP und DCP. Die CP AcpK und TycC3-PCP, die beide dem Sekundärmetabolismus zugeordnet werden können, werden von AcpS hingegen nicht modifiziert.

5.1.3 Biochemische Charakterisierung von AcpS und Sfp

5.1.3.1 Entwicklung einer HPLC Trennmethode für apo- und holo-CP

Da der Radioaktivassay nur eine qualitative Aussage über die Modifikation von CP durch PPTasen liefert, wurde eine HPLC-Methode benutzt, um kinetische Konstanten zu bestimmen. Mit dieser Methode wird die Menge an gebildetem *holo*-CP nach der Modifikation durch eine PPTase durch Trennung von *apo*- und *holo*-CP an einer C_{18} reversed phase HPLC-Säule (s. 4.3.2) bestimmt. Die Methode ist prinzipiell für alle hier untersuchten CP verwendbar, muss jedoch im Detail für jedes CP angepasst werden.

Eine ähnliche Methode war zuvor von Lambalot und Mitarbeitern entwickelt worden, um reines *apo*-CP zu erhalten (71). Dort wurden *apo*- und *holo*-Form von *E. coli* FAS ACP auf einer präparativen C_{18} -Säule getrennt, indem ein Gradient von Wasser auf Isopropanol angelegt wurde. Diese Methode konnte ich im analytischen Maßstab auch für B.s.-ACP verwenden (s. Abb. 23), während andere CP sich damit nicht in ihre *apo*- und *holo*-Form trennen ließen. Durch Variation des Lösungsmittels (meist wurde Acetonitril oder Methanol verwendet) und der Säulentemperatur konnte nicht nur die Trennung von B.s.-ACP verbessert, sondern die Trennung für andere CP erst möglich gemacht werden (s. 4.3.2). Die Verwendung von HPLC-MS erlaubte außerdem die eindeutige Zuordnung der UV- und MS-

Signale zur *apo*- bzw. *holo*-Form des CP. Da für die biochemische Charakterisierung die CP in der Form eingesetzt wurden, wie sie nach der heterologen Produktion in *E. coli* vorlagen, konnte auf diese Weise auch die Menge an *holo*-CP, die bereits vorhanden war, bestimmt werden. Für die hier verwendeten CP betrugen die Retentionszeiten der *holo*- und *apo*-Form: B.s.-ACP: 24.3 bzw. 25.2 min, AcpK: 53.9 bzw. 54.8 min, TycC3-PCP: 10.52 bzw. 12.15 min, DCP: 23.51 bzw. 25.06 min.

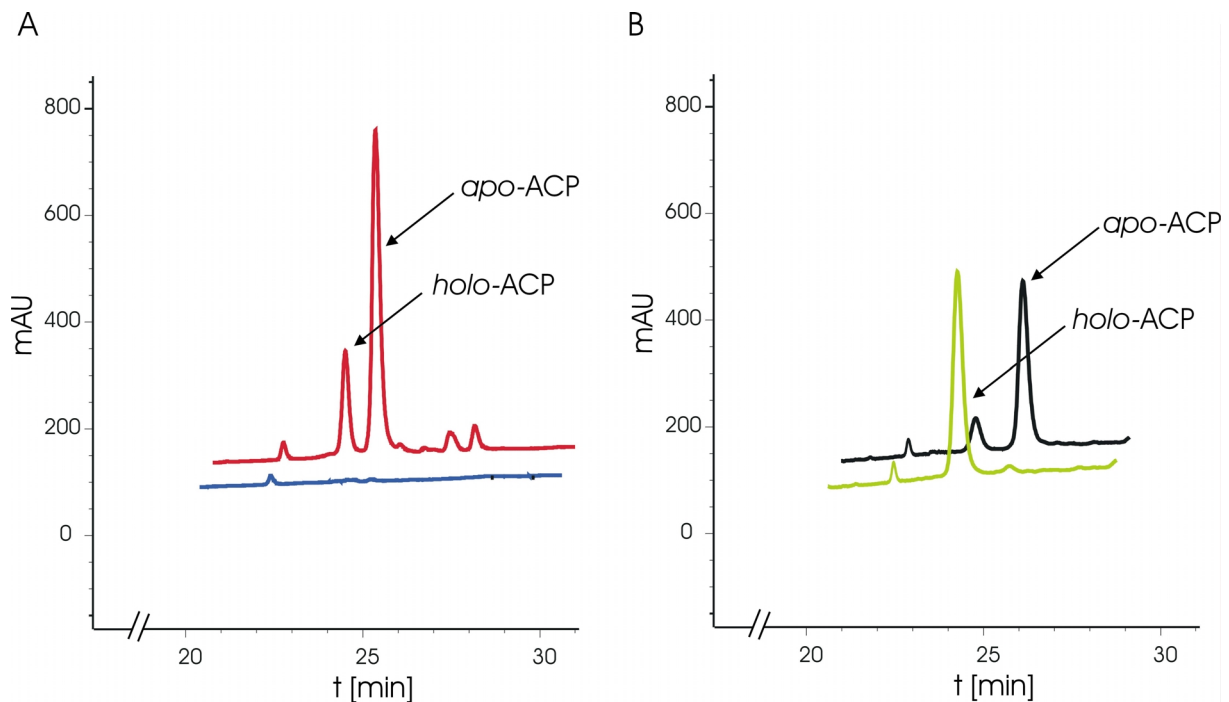


Abb. 23: HPLC Diagramm der Trennung von B.s.-ACP in seine *apo*- und *holo*-Form. A. Dargestellt ist ein Chromatogramm einer analytischen *reversed phase* C_{18} -HPLC-Säule unter Zugabe von B.s.-ACP (rot) sowie ein Chromatogramm ohne Zugabe von ACP (blau). B. Trennung von B.s.-ACP vor der Modifikation durch AcpS (schwarz) und danach (grün).

5.1.3.2 Biochemische Charakterisierung von AcpS und Sfp

Vor der Charakterisierung der PPTasen mit den CP musste bestimmt werden, wie stark sie *in vivo* durch eine *E. coli* PPTase während der heterologen Produktion modifiziert worden waren. Die Analyse des *apo*- zu *holo*-Verhältnis der CP ergab: B.s.-ACP: 84% zu 16%, AcpK: 98% zu 2%, TycC3-PCP: 95% zu 5%, DCP: 49% zu 52%. Die Menge an bereits vorhandenem *holo*-CP musste bei der Charakterisierung der PPTasen berücksichtigt werden, da in allen Assays grundsätzlich *apo/holo*-Mischungen eingesetzt wurden.

Um eine Reaktion pseudo-erster Ordnung zu erhalten wurde das zweite Substrat der PPTase, CoA, im Sättigungsbereich bei 1 mM gehalten, während die Konzentration des CP zur Bestimmung der K_m - und k_{cat} -Werte variiert wurde. Die so erhaltenen Geschwindigkeits-

/Substratkonzentrationswertepaare wurden gegeneinander aufgetragen und anschließend eine Gleichung vom Michaelis-Menten-Typ angepasst (Abb. 24). Auf diese Weise wurde ein K_m -Wert von $8.73 \pm 0.73 \mu\text{M}$ und ein k_{cat} -Wert von $169 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ von AcpS für DCP Konzentrationen von 1-76 μM bestimmt (Abb. 24 A). Sfp hat einen K_m von $50.4 \pm 5.3 \mu\text{M}$ und einen k_{cat} von $287 \pm 16 \text{ min}^{-1}$ für DCP Konzentrationen von 1-102 μM (Abb. 24 B). Wurde die B.s.-ACP Konzentration variiert, konnte bei Sfp das gleiche Phänomen beobachtet werden, wie zuvor schon bei AcpS (92). Es wurde ein erster Sättigungsbereich zwischen 2-15 μM ACP erreicht, wobei der K_m $1.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ und der k_{cat} $1.7 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$ betrug (Abb. 24 C). Wurde die ACP Konzentration über 15 μM hinaus bis 150 μM erhöht, konnte ein zweiter Sättigungsbereich erreicht werden (Abb. 24 D), wobei auch ein zweiter K_m von $38 \pm 8 \mu\text{M}$ und ein zweiter k_{cat} von $12.5 \pm 1.0 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden konnte. Die Werte von Sfp für niedrige ACP Konzentrationen stehen im Einvernehmen mit denen, die für die Interaktion von Sfp mit *E. coli* FAS ACP bestimmt wurden (K_m von 6 μM und k_{cat} von 5.8 min^{-1}) (23). Zuletzt konnte die Modifikation von AcpK durch Sfp quantifiziert und ein K_m von $7.9 \pm 2.1 \mu\text{M}$ sowie ein k_{cat} von $3.2 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden (Abb. 24 E). Alle kinetischen Konstanten sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Kinetische Konstanten von *B. subtilis* AcpS und Sfp für DCP, ACP und AcpK

Substrat	$K_m [\mu\text{M}]$		$k_{\text{cat}} [\text{min}^{-1}]$		k_{cat}/K_m [$\text{min}^{-1}/\mu\text{M}^{-1}$]	
	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp
<i>apo</i> -DCP	8.73 ± 0.73	50.4 ± 5.3	169 ± 4	287 ± 16	19.4	5.7
<i>apo</i> -B.s.-ACP (2-8 μM)	0.2 ± 0.3^a	1.4 ± 0.3	22 ± 2^a	1.7 ± 0.1	129	1.2
<i>apo</i> -B.s.-ACP (20-200 μM)	68 ± 11^a	38 ± 8	125 ± 9^a	12.5 ± 1.0	1.8	0.3
<i>apo</i> -AcpK	nbb. ^b	7.9 ± 2.1	nbb.	3.2 ± 0.2	nbb.	0.4

^aFinking (92), ^bnbb.: nicht bestimmbar

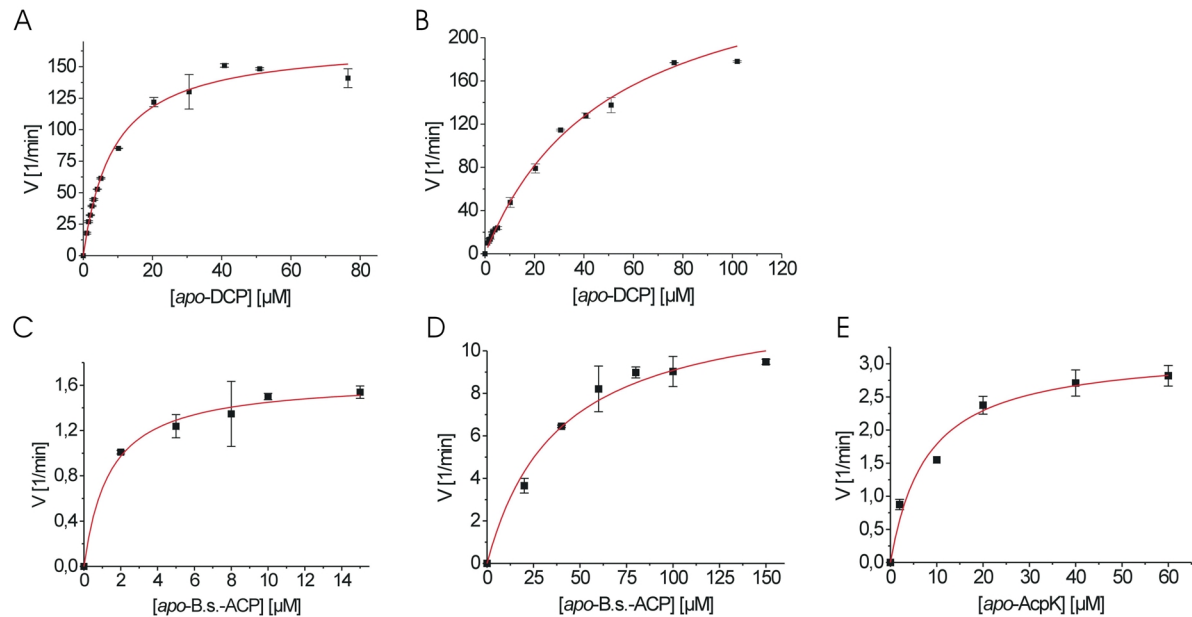


Abb. 24: Bestimmung der kinetischen Konstanten von *B. subtilis* AcpS für apo-DCP und Sfp für apo-DCP, apo-B.s.-ACP und apo-AcpK. Reaktionsansätze wurden im Fall von AcpS (5.6 nM) 10 min lang, im Fall von Sfp (10 nM) 30 min (bei DCP 10 min) inkubiert. Für die Anpassung wurde eine hyperbolische Michaelis-Menten-Funktion verwendet. **A.** Plot der Geschwindigkeitswerte gegen Substratkonzentration von AcpS für apo-DCP Konzentrationen von 1-76 μM, die CoA-Konzentration wurde bei 1 mM konstant gehalten. **B.** im Fall von Sfp wurde die apo-DCP Konzentration im Bereich von 1-102 μM variiert. **C.** Ein erster Sättigungsbereich für die Modifikation von apo-B.s.-ACP durch Sfp wird bei 15 μM erreicht. **D.** wird die apo-B.s.-ACP Konzentration jedoch weiter erhöht, so wird für Konzentrationen von 20-150 μM ein zweiter Sättigungsbereich erreicht. **E.** Normales Michaelis-Menten-Verhalten von Sfp für apo-AcpK Konzentrationen zwischen 2-60 μM.

5.1.4 AcpS-CP Wechselwirkung: Das hPCP

Sowohl die biochemische Charakterisierung von *B. subtilis* AcpS, als auch die von *E. coli* AcpS (72) deuten darauf hin, dass AcpS dem Organismus lediglich für die Modifikation des FAS ACP dient. Aufgrund der ähnlichen Struktur der CP ließ sich keine Determinante für die Diskriminierung der PPTasen von verschiedenen CP-Typen ausmachen (35,62,167). Erste Hinweise auf die CP-Erkennungsstelle in AcpS lieferte die *B. subtilis* AcpS-ACP Cokristallstruktur (78) (Abb. 25).

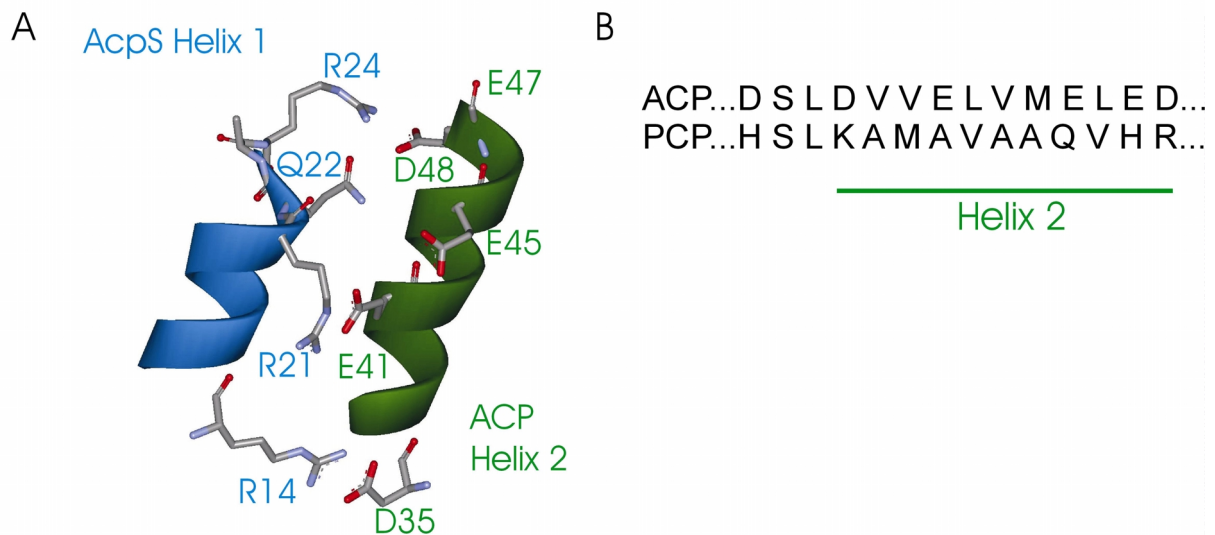


Abb. 25: Interaktion zwischen *B. subtilis* AcpS und ACP in der Cokristallstruktur. **A.** Gezeigt ist die Helix 1 von AcpS und Helix 2 von ACP. Hier finden sich die meisten Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen. **B.** AS-Sequenz der Helix 2 von B.s.-ACP (ACP) und TycC3-PCP (PCP). Während ACP viele saure AS enthält, sind die entsprechenden AS des PCP zumeist basisch. In hPCP wurden die hier gezeigten 14 AS des PCP durch die darüber gezeigten AS des ACP ersetzt.

Die AcpS-ACP Cokristallstruktur zeigte, dass die meisten Wechselwirkungen zwischen Helix 1 von AcpS und Helix 2 von ACP stattfinden. Ähnliche Hinweise lieferte eine Untersuchung von Zhang und Mitarbeitern für die Wechselwirkung der β -Ketoacyl-ACP Synthase III (FabH) mit ACP (beides Proteine aus *E. coli*) (100). Diese Analyse ging zunächst von einer computergestützten Untersuchung der ACP-Erkennungsstelle aus, die später durch ortsergerichtete Mutagenese bestätigt wurde. Auch hier lagen die meisten ACP-Reste, die mit der Ketosynthase wechselwirkten im Bereich der Helix 2. Im Licht dieser Daten sollten im Rahmen dieser Dissertation die Wechselwirkungen zwischen PPTasen und den CP geklärt werden. Dazu wurde auf DNA-Ebene der für die Helix 2 kodierende, Bereich in TycC3-PCP durch den entsprechenden Bereich von B.s.-ACP ausgetauscht. Während die Zahl der hydrophoben AS dadurch nahezu konstant geblieben ist, sind die basischen AS des PCP durch saure AS ersetzt worden. Zur Konstruktion des neuen CP diente zunächst das Expressionsplasmid für TycC3-PCP als Templat in einer PCR (Abb. 26). In dieser PCR wurden Primer verwendet, die außer dem mit *tycC3-PCP* überlappenden Bereich auch noch die Sequenz trugen, die für die Helix 2 von B.s.-ACP kodiert. Diese PCR lieferte ein lineares Produkt, an dessen Enden jeweils eine *SacI*-Schnittstelle neu eingeführt wurde. Nach Verdau des PCR Produkts mit diesem Enzym konnte das lineare PCR Produkt durch eine Ligase rezykliert werden. In diesem neuen Konstrukt ist jetzt der kodierende Bereich für Helix 2 von TycC3-PCP vollständig durch den entsprechenden Bereich von B.s.-ACP ersetzt (Abb. 26).

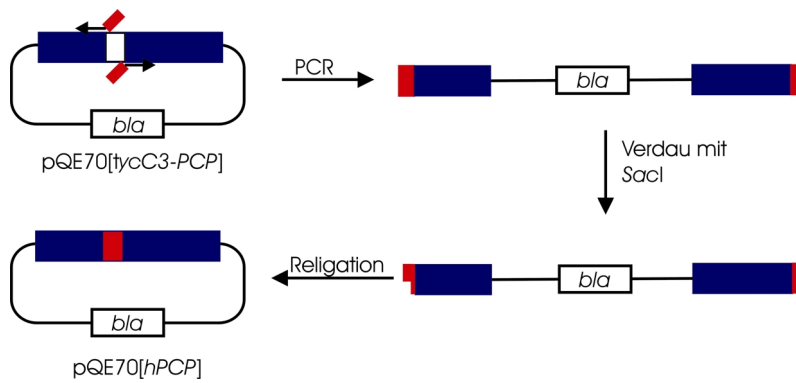


Abb. 26: Konstruktion von pQE70[hPCP]. Eine PCR mit dem Templat pQE70[tycC3-PCP] und Oligonukleotiden, welche die kodierende Sequenz für Helix 2 von B.s.-ACP trugen lieferte ein lineares Produkt, welches nach Verdau mit *SacI* zum neuen Konstrukt pQE70[hPCP] religiert werden konnte. Bla: β -Lactamase (Ampicillin^R).

Der überwiegende Teil des so hergestellten Proteins stammt von TycC3-PCP. Da aber 14 AS von B.s.-ACP stammen, handelt es sich um ein ACP/PCP Hybridprotein und wurde deshalb konsequenterweise als hPCP bezeichnet. Obwohl lediglich die Helix 2 getauscht wurde, zeigt es v.a. im Hinblick auf den pI völlig veränderte Eigenschaften (Tab. 15). Obwohl sich das Molekulargewicht verglichen mit TycC3-PCP kaum geändert hat, ist der pI von ehemals 7.66 fast auf den des B.s.-ACP (4.22) gesunken. Dies deutet darauf hin, dass die ausgetauschte Helix für den Unterschied zwischen ACP und PCP eine wesentliche Rolle spielt.

Tabelle 15: Eigenschaften von TycC3-PCP, hPCP und B.s.-ACP.

Protein	Länge [AS]	Molekulargewicht [Da]	pI
TycC3-PCP-His ₆	91	10104	7.66
hPCP-His ₆	91	10191	4.95
B.s.-ACP-His ₆	87	9801	4.22

5.1.4.1 Heterologe Produktion und Reinigung von hPCP

E. coli M15 diente zur heterologen Produktion von hPCP als C-terminales His₆-Fusionsprotein. Anschließend erfolgte seine Reinigung mittels Ni²⁺-NTA Chromatographie gefolgt von Gelfiltrationschromatographie. Abb. 27 zeigt das gereinigte hPCP neben TycC3-PCP und B.s.-ACP. Man sieht das Monomer von TycC3-PCP und hPCP sowie das *holo*-Dimer von B.s.-ACP. Pro Liter Zellkultur konnten 20 mg hPCP mit einer Reinheit von >95% erhalten werden.

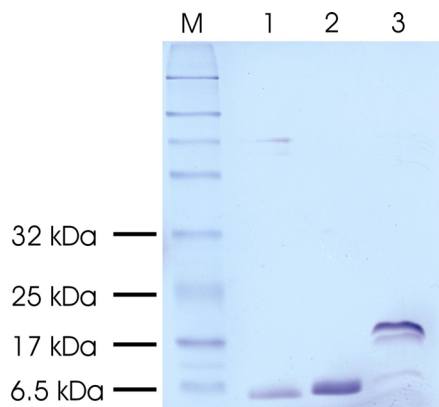


Abb. 27: Coomassie Brilliant blue gefärbtes SDS-Gel der Reinigung von hPCP. Spur 1: hPCP, 2: TycC3-PCP, 3: B.s.-ACP. M: Proteinmarker.

5.1.4.1 Qualitative Analyse mit [^3H]-CoA

Da alle vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, dass AcpS *in vitro* keine PCP als Substrate akzeptiert, wurde die Eignung von hPCP als Substrat für die PPTasen AcpS und Sfp zunächst in einem qualitativen Test untersucht. Dazu wurden 1 μM CP (B.s.-ACP, hPCP oder TycC3-PCP) mit 5.6 nM AcpS bzw. 25 nM Sfp nach 4.3.1 30 min bei 37 °C inkubiert. Wie in Abb. 28 gezeigt, war AcpS in der Lage ACP sowie das neue ACP/PCP Hybridprotein, hPCP zu erkennen. Wie erwartet wurde TycC3-PCP von AcpS jedoch nicht erkannt, wohingegen Sfp alle hier verwendeten Proteine modifizierte.

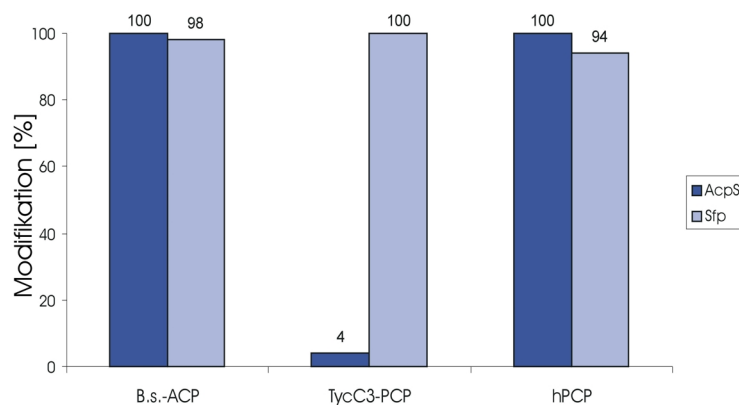


Abb. 28: Modifikation von B.s.-ACP, TycC3-PCP und hPCP durch AcpS und Sfp. 1 μM der CP wurde mit 5.6 nM AcpS oder 25 nM Sfp und 20 μM CoA sowie 200 nM [^3H]CoA 30 min lang inkubiert. Gezeigt ist die Modifikation in % der CP durch AcpS (dunkelblau) und Sfp (hellblau). Sfp erkennt alle CP, wohingegen AcpS ACP und hPCP erkennt, PCP jedoch nicht.

5.1.4.2 Biochemische Charakterisierung von AcpS und Sfp mit hPCP

Da, wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, AcpS in der Lage ist das Hybridprotein *in vitro* zu modifizieren, wurde die HPLC-Methode (4.3.2) zur Quantifizierung der Modifikation des hPCP durch AcpS und Sfp (83) eingesetzt. Zunächst konnte mit dieser Methode festgestellt werden, dass hPCP nach der heterologen Produktion in *E. coli* bereits zu 51% in der *holo*-Form vorlag. Im Vergleich dazu wurde TycC3-PCP, welches das

Ausgangsprotein des hPCP ist, unter den gleichen Bedingungen lediglich zu 7% *in vivo* durch eine endogenen *E. coli* PPTase modifiziert. Zur Bestimmung der K_m - und k_{cat} -Werte enthielten die Reaktionsansätze 11.2 nM AcpS oder 10 nM Sfp und wurden 10 min bei 37 °C inkubiert. Die kinetischen Konstanten wurden durch eine Michaelis-Menten-Anpassung der experimentellen Daten ermittelt. Für apo-hPCP Konzentrationen zwischen 2-180 μ M war der K_m von AcpS $21.6 \pm 3 \mu$ M mit einem k_{cat} von $14.35 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$. Der K_m von Sfp unter gleichen Bedingungen war $26 \pm 6 \mu$ M und der k_{cat} $96 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ (Tab. 16). Zum besseren Vergleich wurde auch der K_m von Sfp für TycC3-PCP bestimmt (83). Dieser war $4.45 \pm 1 \mu$ M, der zugehörige k_{cat} ebenfalls $96 \pm 4 \text{ min}^{-1}$. Im Gegensatz zu den oben gemachten Beobachtungen, dass zwei K_m - und k_{cat} -Werte von AcpS und Sfp bei hohen und niedrigen ACP Konzentrationen bestimmt werden konnten, konnte für hPCP nur jeweils ein K_m - und k_{cat} -Wert determiniert werden.

Tabelle 16: Kinetische Konstanten von AcpS und Sfp für PCP und hPCP

Substrat	K_m [μ M]		k_{cat} [min^{-1}]		k_{cat}/K_m [$\text{min}^{-1}/\mu\text{M}^{-1}$]	
	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp
apo-hPCP (2-180 μ M)	21.6 ± 3	26 ± 6^a	14.35 ± 0.5	96 ± 4^a	0.66	3.69
apo-PCP (2-140 μ M) ^a	nbb. ^b	4.45 ± 1	nbb.	96 ± 4^a	nbb.	21.57

^aMofid (83,168), ^bnbb.: nicht bestimmbar

5.1.5 Mutationsanalyse von AcpS

Die im vorherigen Kapitel ermittelten Daten bestätigten die Theorie, dass die Erkennung des CP im Falle von AcpS durch die Helix 1 des Enzyms moduliert wird. M.R. Mofid konnte mit weitergehenden Untersuchungen durch Mutationsanalyse von PCP einzelne Reste identifizieren, die eine entscheidende Rolle für diese Interaktion spielen (83). Wie sich herausstellte, war eine einzelne Mutation in PCP des Rests K47 zu D47 ausreichend, um die Modifikation durch AcpS zu ermöglichen. Allerdings war dies nur mit deutlicher Einbuße an katalytischer Effizienz gegenüber hPCP möglich. Vergleiche von PCP mit der AcpS-ACP Cokristallstruktur machen deutlich, dass der Rest D38 in ACP, welcher der AS 47 in PCP entspricht, mit R14 von AcpS interagiert (Abb. 25). Nach einem Modell von Mofid ist neben dem Rest R14 in der aktiven Tasche von AcpS der Rest K44 des benachbarten AcpS-

Monomers ebenfalls für die Wechselwirkung mit ACPs D38 zuständig (s. Diskussion). Dies konnte jedoch in der AcpS-ACP Cokristallstruktur nicht gezeigt werden, da Parris und Mitarbeiter in ihren Untersuchungen die K44A Mutante von AcpS kristallisiert hatten.

Um die Frage zu beantworten, ob die AcpS AS R14 und K44 eine entscheidende Rolle für die Wechselwirkung mit ACP spielen und ob sich eventuell die Substrattoleranz von AcpS auf PCP erweitern lässt, wurden diese Reste jeweils zu Alanin mutiert bzw. die Mutanten R14K, K44D und die Doppelmutante hergestellt. Durch die Superposition der Kristallstrukturen wird angenommen, dass den AcpS-Resten R14 und K44 die Sfp-AS K112 und D40 entsprechen. In Sfp sind diese Reste beide in die CP Erkennung involviert.

Die Mutationen wurden nach der in 4.1.2 beschriebenen Methode mit dem *QuickChange site directed mutagenesis kit* (Stratagene, Heidelberg) eingeführt. Für die Mutation R14A, R14K, K44A und K44D wurde das von Mootz klonierte Konstrukt pTz18R[*acpS*] (94) als Templat in einer PCR mit den Oligonukleotidpaaren RF081, RF082; RF083, RF084; RF077, RF078; bzw. RF057, RF058 benutzt (s. Anhang, Tab. 21). Die Doppelmutante R14KK44D wurde ausgehend von pTz18R[*acpSR14K*] mit dem Oligonukleotidpaar RF083, RF084 hergestellt. Da auf diese Weise keine neuen Schnittstellen in *acpS* eingeführt werden konnten, wurde die Integrität der Konstrukte durch Sequenzierung verifiziert.

5.1.5.1 Produktion und Reinigung der AcpS Mutanten

Alle AcpS Mutanten wurden heterolog in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt. Da die Proteine keinen Affinitätstag besaßen, wurde eine Reinigungsstrategie unter Verwendung von Gelfiltrations- und Ionentauschchromatographie, wie unter 4.2.3.3 beschrieben, entwickelt. Die Reinigung sowohl der C-, als auch der N-terminalen AcpS-His₆ Fusion misslang, da entweder größtenteils unlösliches Protein vorlag bzw. nicht produziert wurde, oder nicht an Ni²⁺-NTA Affinitätssäulen band. Mit dieser Reinigungsstrategie konnten die AcpS Mutanten in Ausbeuten zwischen 2-5 mg pro Liter Zellkultur erhalten werden. Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE Analyse bestimmt und betrug in allen Fällen >90% (Abb. 29). Zusätzlich zur Sequenzierung wurde die molekulare Masse der Mutanten von U. Linne durch ESI-MS überprüft.

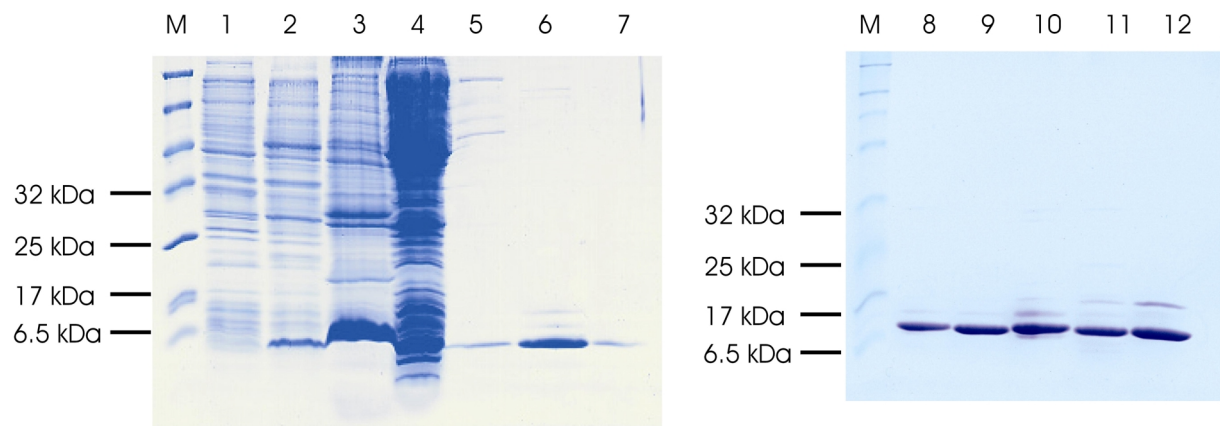


Abb. 29: Coomassie Brilliant blue gefärbte Gele der Reinigung der AcpS Mutanten. Am Beispiel von AcpSK44D (Spur 1-7 und 11) ist die Produktion sowie Reinigung zu sehen. Spur 1: Gesamtzellextrakt bei $t = 0$ h; 2: Gesamtzellextrakt bei $t = 3$ h; 3: Pellet nach Zellaufschluß; 4: Überstand nach Zellaufschluß; 5: Vereinigte Fraktionen der ersten Gelfiltration; 6: Vereinigte Fraktionen des Ionentauschers; 7: Vereinigte Fraktionen der zweiten Gelfiltration. Spuren 8-12 zeigen jeweils die vereinigten Fraktionen der zweiten Gelfiltration, nach dem Ankonzentrieren, von 8: AcpSR14A; 9: AcpSK44A; 10: AcpSR14K; 11: AcpSK44D; 12: AcpSR14KK44D. M: Proteinmarker.

5.1.5.2 Biochemische Charakterisierung der AcpS Mutanten

Um zu den Effekt der Mutationen auf die Aktivität von AcpS zu untersuchen, wurden die Michaelis-Konstanten der Proteine mit B.s.-ACP durch HPLC-Analyse (4.3.2) bestimmt. Dazu wurde B.s.-ACP zwischen 2-17 μM in neun Schritten bzw. zwischen 34-170 μM in sechs Schritten variiert, während die Mutanten in folgenden Konzentrationen eingesetzt wurden: AcpSR14A: 50 nM, AcpSR14K: 4.9 nM, AcpSK44A: 508 nM, AcpSK44D: 56 nM, AcpSR14KK44D: 50 nM. Die Reaktionsansätze wurden zwischen 3 min (AcpSR14KK44D), 10 min (AcpSR14A, K44A, R14K) und 15 min (AcpSK44D) inkubiert. Die Menge an *holo*-B.s.-ACP wurde anschließend durch HPLC-Analyse bestimmt, auf die gebildete *holo*-B.s.-ACP Menge zurückgerechnet, und daraus die Geschwindigkeitswerte berechnet. Diese wurden dann gegen die Substratkonzentration aufgetragen und eine Funktion vom Michaelis-Menten-Typ angepasst (Abb. 30, Tab. 17). Ein auffälliges Merkmal dieser Kinetiken ist die Tatsache, dass alle Mutanten lediglich einen K_m - und k_{cat} -Wert für ACP aufweisen. Die einzige Ausnahme stellt AcpSR14K dar. Die Mutation von Arginin zu Lysin stellt eine relativ konservative Veränderung dar, welche die kinetischen Eigenschaften von AcpS nicht sehr beeinflusst. Diese Mutante hat einen K_m von 6.4 ± 1.9 μM und einen k_{cat} von 96.5 ± 12 min^{-1} für ACP Konzentrationen zwischen 2-34 μM sowie einen K_m von 25.8 ± 6.1 und einen k_{cat} von 153.5 ± 10 für ACP Konzentrationen von 17.4-173 μM (Abb. 30 A und B).

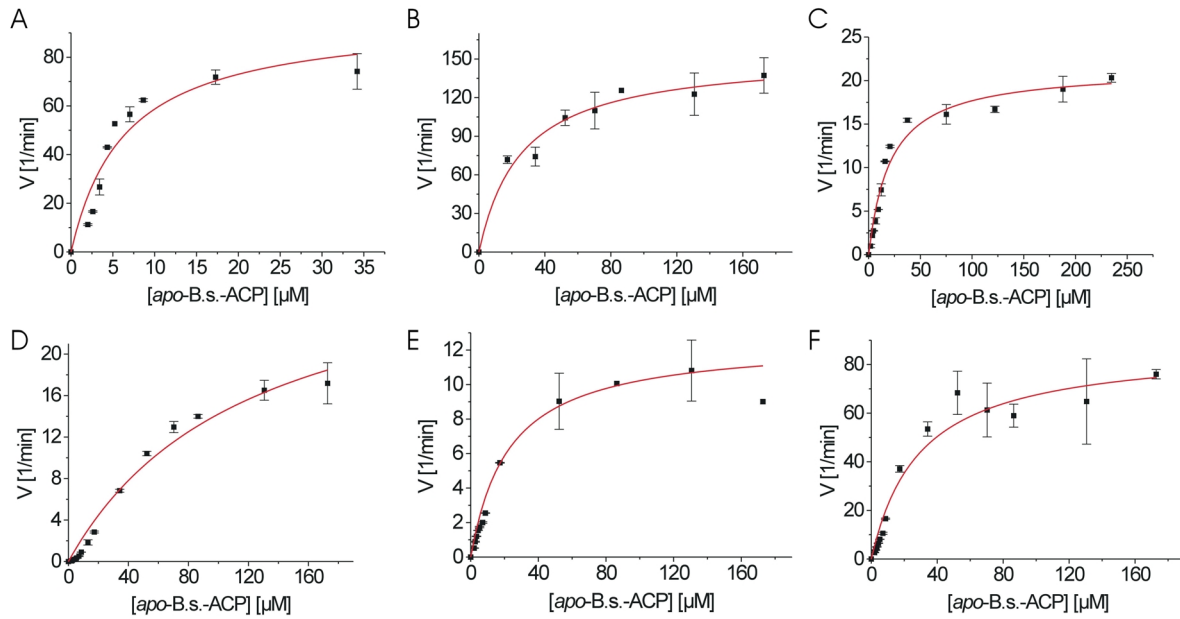


Abb. 30: Bestimmung der Michaelis-Konstanten der AcpS-Mutanten für *apo-B.s.-ACP*. Reaktionsansätze mit 4.9 nM AcpSR14K, 50 nM AcpSR14A, 508 nM AcpSK44A, 56 nM AcpSK44D oder 50 nM AcpSR14KK44D wurden 10 min inkubiert. Für die Anpassung wurde eine hyperbolische Michaelis-Menten-Funktion verwendet. **A.** Plot der Geschwindigkeitswerte gegen Substratkonzentration von AcpSR14K für *apo-B.s.-ACP* Konzentrationen von 2-34 μM , die CoA-Konzentration wurde bei 500 μM konstant gehalten. **B.** zweiter Sättigungsbereich von AcpSR14K mit *apo-B.s.-ACP* Konzentrationen von 17.4-173 μM . **C** Im Fall von AcpSR14A wurde die *apo-B.s.-ACP* Konzentration von 1.9-235 μM variiert. **D.** Für AcpSK44A wurden 2-173 μM *apo-B.s.-ACP* verwendet. **E.** Im Fall von AcpSK44D wurden *apo-B.s.-ACP* Konzentrationen von 2-173 μM verwendet genauso wie **F.** Im Fall von AcpSR14KK44D.

Die beiden Alaninmutanten, AcpSR14A und AcpSK44A (Abb. 30 C bzw. D), haben einen im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 17) deutlich niedrigeren k_{cat} -Wert von $21.4 \pm 1 \text{ min}^{-1}$ bzw. $31.3 \pm 4.0 \text{ min}^{-1}$ für *apo-B.s.-ACP* Konzentrationen von 1.9-235 μM bzw. 2-173 μM . Im Fall von AcpSR14A ist der K_m -Wert auf $21.2 \pm 3 \mu M$ gefallen, wohingegen im Fall von AcpSK44A ein mit $120.5 \pm 28.1 \mu M$ deutlich erhöhter K_m -Wert zu verzeichnen ist. Die katalytische Effizienz dieser Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich gefallen, was die Bedeutung dieser Reste für die ACP Erkennung verdeutlicht. AcpSK44D hatte einen K_m von $22.7 \pm 5.4 \mu M$ und einen k_{cat} von $12.5 \pm 0.9 \text{ min}^{-1}$ für *apo-B.s.-ACP* Konzentrationen zwischen 2-173 μM . Die Doppelmutante, AcpSR14K44D, wurde mit *apo-B.s.-ACP* Konzentrationen zwischen 2 und 173 μM charakterisiert und hatte einen K_m von $29.4 \pm 6.4 \mu M$ und einen k_{cat} von $87.4 \pm 6.4 \text{ min}^{-1}$.

Tabelle 17: K_m - und k_{cat} -Werte der AcpS Mutanten mit apo-B.s.-ACP

AcpS Mutante	K_m [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{min}^{-1}/\mu\text{M}^{-1}$]
R14A, 1.9-235 μM ACP	21.2 ± 3	21.4 ± 1	1.01
K44A, 2-173 μM ACP	120.5 ± 28.1	31.3 ± 4	0.26
R14K, 2-34 μM ACP	6.4 ± 1.9	96.5 ± 11.9	15
R14K, 17.4-173 μM ACP	25.8 ± 6.1	153.5 ± 10	5.96
K44D, 2-173 μM ACP	22.7 ± 5.4	12.54 ± 0.9	0.55
R14KK44D, 2-173 μM ACP	29.41 ± 6.4	87.4 ± 6.4	2.97

5.1.5.3 Untersuchung der Substratselektivität der AcpS-Mutanten

Da die katalytische Effizienz der AcpS Mutanten K44D, R14K sowie K44DR14K mit B.s.-ACP (Tab. 17) im Bereich der katalytischen Effizienz liegt, die Sfp für B.s.-ACP hat, sollte untersucht werden, ob TycC3-PCP als Substrat von den Mutanten akzeptiert wird. Zu diesem Zweck wurden alle fünf AcpS Mutanten sowie Sfp und AcpS (500 nM) mit sowohl ACP, als auch PCP (50 μM) in Gegenwart von [^3H]-CoA 18 h inkubiert. Um zu testen, ob sich das pH-Optimum der AcpS-Mutanten geändert hat, wurden Reaktionsansätze sowohl bei pH 8.8 (pH-Optimum von AcpS), als auch bei pH 6.0 (pH-Optimum von Sfp) inkubiert. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 31 dargestellt. Wie erwartet konnten alle AcpS Mutanten, AcpS und Sfp B.s.-ACP modifizieren. AcpS sowie die AcpS Mutanten akzeptierten PCP jedoch nicht als Substrat. Als einzige Ausnahme ist die Menge des durch AcpSK44D modifizierten ACP leicht erhöht verglichen mit der durch AcpS modifizierten Menge. Außerdem wurde ACP bei pH 8.8 deutlich stärker modifiziert, als bei pH 6.0. Dies trifft auf alle AcpS Mutanten zu und deutet darauf hin, dass das pH-Optimum der Mutanten nicht verändert wurde. Interessanter Weise resultierte die Inkubation von AcpS mit PCP auch in geringfügiger Modifikation des CP, die gegenüber der Kontrollreaktion ohne PPTase um den Faktor 5.5 erhöht ist.

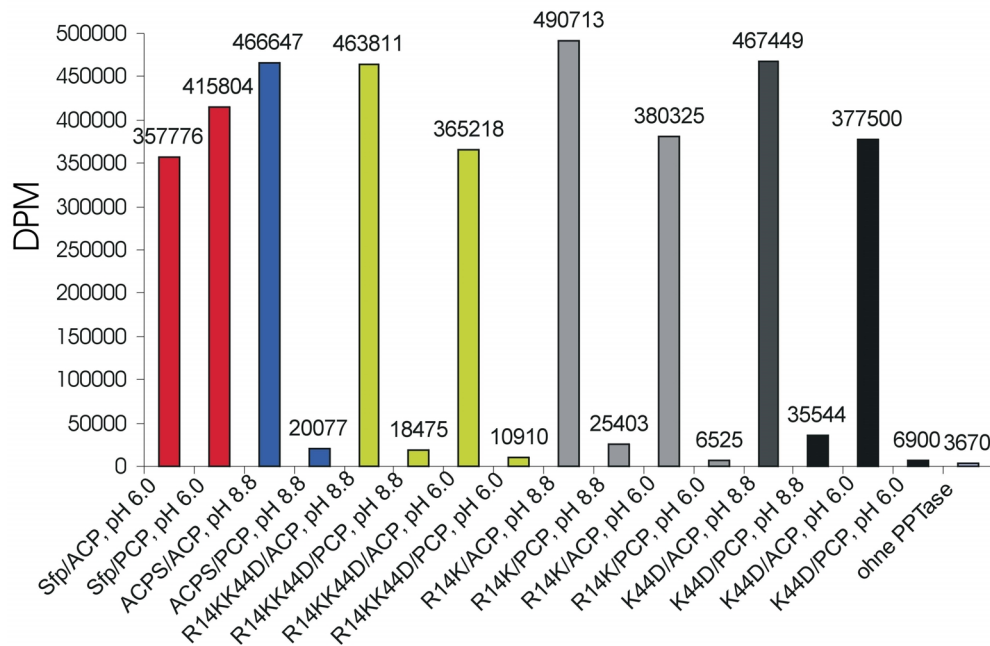


Abb. 31: Substratselektivität der AcpS-Mutanten. 500 nM PPTase wurden mit 50 μ M CP und 20 μ M CoA sowie 200 nM [3 H]CoA 18 h inkubiert. Gezeigt sind die DPM, die mit den verschiedenen PPTasen bei pH 8.8 oder 6.0 gemessen werden konnten. Kontrollreaktionen enthielten AcpS, Sfp oder keine PPTase. Wie erwartet wurde B.s.-ACP (ACP) durch AcpS und TycC3-PCP (PCP) durch Sfp modifiziert. Die AcpS-Mutanten modifizierten lediglich ACP. Mit Ausnahme von Mutante K44D, die eine leicht erhöhte Modifikationsrate für PCP zeigt, wurde PCP von keiner der Mutanten signifikant modifiziert.

5.2 Phosphopantetheintransfer in *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein Gram-negatives, opportunistisches, humanpathogenes Bakterium, das ein Hauptverursacher für Infektionen in Brandpatienten darstellt, aber auch dafür bekannt ist Lungenentzündungen und Augenkrankheiten zu verursachen (169). *Pseudomonas* spp. scheiden toxische Substanzen wie z.B. Elastase, Proteasen und Cyanid aus und sind gegenüber einer Behandlung mit antimikrobiellen Agentien oft resistent (170,171). Zwei Siderophore, Pyoverdin (Pvd) und Pyochelin (Pch), die unter Eisenmangelbedingungen produziert werden, sind mit der hohen Virulenz von *P. aeruginosa* assoziiert (26-28,172).

Nach unseren Untersuchungen des *P. aeruginosa* Genoms mit Hilfe des Programms BLAST (95,96) enthält es lediglich einen putativen ORF, der für eine PPTase von 242 AS (27 kDA, pI 6.77) (*PA1165*, GeneBank® accession number AAG04554). Nach diesen Charakteristika sollte dieses Enzym zur Gruppe der Sfp-Typ PPTasen gehören, hat aber nur geringe Ähnlichkeit mit Sfp (13.9%, s. Einleitung Abb. 9). Im Gegensatz zu Sfp ist diese PPTase nicht mit NRPS-Clustern assoziiert (Abb. 32).

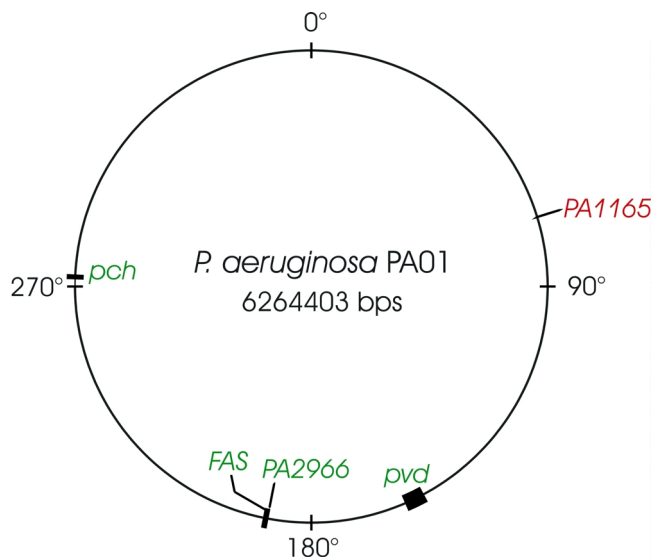


Abb. 32: Genkarte des *P. aeruginosa* PA01 Genoms. Gezeigt sind der *PA1165*-Lokus, der für die putative PPTase kodiert, der Locus *PA2966*, der für das FAS ACP kodiert sowie die Loci, die für die FAS sowie die NRPS Pch und Pvd kodieren.

Nach der im Folgenden beschriebenen Charakterisierung wurde die von *PA1165* kodierte PPTase ihrer Funktion zufolge in *P. aeruginosa* Carrier Protein Synthase (PcpS) umbenannt. Ebenso konnte der Locus *PA2966* als das Gen identifiziert werden, das für das FAS ACP kodiert und in *acpP* umbenannt.

Da im *P. aeruginosa* Genom kein weiteres Gen gefunden werden konnte, dass für eine PPTase kodiert, scheint das Bakterium ohne eine AcpS-Typ PPTase auszukommen. Eine solche Situation wurde von H. Mootz in *B. subtilis* durch Deletion des für AcpS kodierenden Gens simuliert (94). Wachstumskurven dieses Stamms zeigten einen gegenüber dem Wildtyp nicht veränderten Phänotyp. Ebenso lag die Produktion des zyklischen Lipopeptids Surfactin auch im Bereich des Wildtyp Produzenten. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass eine AcpS-Typ PPTase für Bakterien, die zusätzlich eine Sfp-Typ PPTase mit breiter Substratselektivität besitzen, entbehrlich ist. Dies warf allerdings die Frage auf, ob die Situation in *P. aeruginosa* lediglich den Verlust der AcpS-Typ PPTase darstellt, oder ob PcpS hinsichtlich seiner Selektivität für CP des Primär- und Sekundärstoffwechsels eine Besonderheit darstellt. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Dr. J. Solsbacher und Dr. D. Konz (Aventis R&T/Phylos GmbH Deutschland) und M. Schobert (AG Prof. Dr. D. Jahn, TU Braunschweig) durchgeführt. Ergebnisse, die nicht von mir selbst erhalten wurden sind daher entsprechend gekennzeichnet.

5.2.1 Auswahl, Produktion und Reinigung der Proteinsubstrate

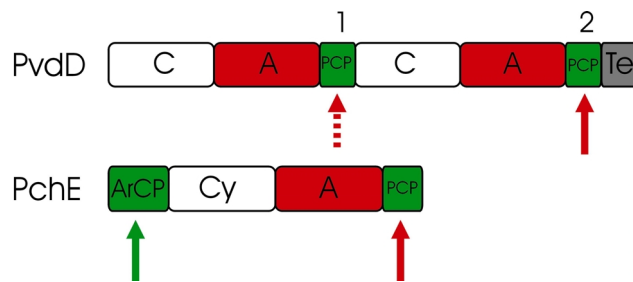


Abb. 33: Auswahl von CP Substraten aus dem Sekundärmetabolismus von *P. aeruginosa*. Gezeigt sind Pyoverdinsynthetase D (PvdD) sowie Pyochelinsynthetase E (PchE). Die Zahlen über PvdD kennzeichnen pvdD1-PCP bzw. pvdD2-PCP. Pfeile zeigen an, ob das Protein in *E. coli* produziert werden konnte (grün) oder nicht (rot). Der gestrichelte rote Pfeil zeigt einen erfolgreichen Test des Proteins im Hefe two-hybrid System (s. 5.2.2.1) an. Abk.: C: C-Domäne, A: A-Domäne, PCP: Peptidyl CP, ArCP: Aryl CP, Te: Te-Domäne.

Zur Charakterisierung von PcpS *in vitro* sollten sowohl das *P. aeruginosa* FAS ACP (P.a.-ACP), B.s.-ACP, als auch CP des Sekundärmetabolismus von *P. aeruginosa* herangezogen werden. Die entsprechenden Protein und Konstruktnamen sowie deren Eigenschaften sind in Tab. 18 zusammengefasst. Als CP des Sekundärmetabolismus (Abb. 33) sollten PvdD1-PCP-His₆, PvdD2-PCP-His₆, PchE-PCP-His₆, PchE-His₆-PCP sowie PchE-ArCP-His₆ verwendet werden.

Tabelle 18: Konstrukte zur Produktion von CP aus *P. aeruginosa*

Konstrukt	codiertes Protein	Größe [kDa]	Kommentar	pI
pQE70[pvdD1-PCP]	PvdD1-PCP-His ₆	9.3	AS 1067-1140 von Pvd Synthetase D	6.70
pQE60[pvdD2-PCP]	PvdD2-PCP-His ₆	9.2	AS 2079-2151 von Pvd Synthetase D	4.86
pQE60[pchE-PCP]	PchE-PCP-His ₆	10.9	AS 1340-1425 der Pch Synthetase E	7.30
pQE30[pchE-PCP]	PchE-His ₆ -PCP	11.4	AS 1340-1425 der Pch Synthetase E	7.30
pQE70[pchE-ArCP]	PchE-ArCP-His ₆	10.5	AS-Reste 1-87 der Pch Synthetase E	4.08

Ein Produktion der PCP Substrate in *E. coli* schlug jedoch fehl, einzig das pchE-ArCP-His₆ konnte als lösliches Protein erhalten werden. Daher wurde zur Charakterisierung das am Besten untersuchte PCP, TycC3-PCP, herangezogen. Sowohl PcpS, als auch B.s.-ACP, pchE-ArCP und TycC3-PCP wurden in *E. coli* als C-terminale His₆-Fusionsproteine produziert werden. Die Reinigung erfolgte mit Ni²⁺-Affinitätschromatographie gefolgt von

Gelfiltration. Die genannten Proteine konnten in Ausbeuten von 5 mg PcpS, 44 mg P.a.-ACP und 19 mg pchE-ArCP mit einer durch SDS-PAGE abgeschätzten Reinheit von >99% erhalten werden (Abb. 34).

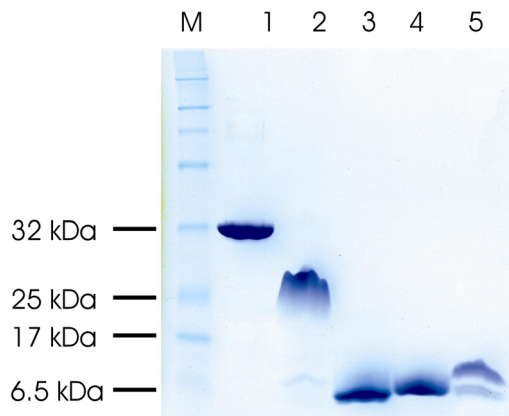


Abb. 34: Coomassie Brilliant blue gefärbtes SDS-Gel der Reinigung von 1: PcpS, 2: P.a.-ACP, 3: pchE-ArCP, 4: TycC3-PCP und 5: B.s.-ACP. M: Proteinmarker.

5.2.2 Charakterisierung von PcpS

Zur Charakterisierung der putativen PPTase wurde zunächst ihre Funktion durch einen Radioaktivassay überprüft, der die Übertragung von [^3H]-4'PP von CoA auf die CP misst. Anschließend wurden sowohl der Aggregationszustand von PcpS, als auch der optimale pH-Wert für die PPTase Aktivität bestimmt, ehe eine Quantifizierung der Aktivität der PPTase vorgenommen wurde. Des Weiteren wurde die Aktivität von PcpS *in vivo* mit Hilfe eines Hefe *two-hybrid* Systems von Solsbacher und Mitarbeitern untersucht. Abschließend wurde von M. Schobert versucht das für PcpS kodierenden Gens, *PA1165*, mit einem von mir klonierten Deletionsvektors zu deletieren.

5.2.2.1 Posttranslationale Modifikation von CP Substraten durch PcpS *in vivo*

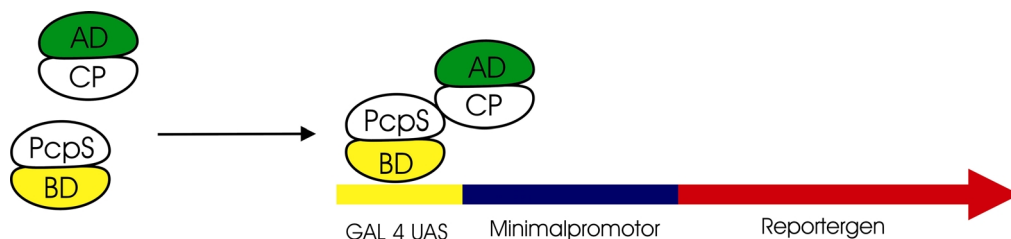


Abb. 35: Aktivierung der Reporterexpression im Hefe *two-hybrid* System. Findet eine erfolgreiche Interaktion zwischen der PcpS-DNA-Bindedomäne und der Aktivierungsdomäne statt, so bindet der Komplex an GAL 4 UAS. Die Aktivierungsdomäne (AD) erhöht die Bindehäufigkeit der RNA-Polymerase an den Minimalpromotor und die Reportergene (*HIS* und *ADE*) werden exprimiert. Abk.: BD: DNA-Bindedomäne, AD: Aktivierungsdomäne, GAL 4 UAS: Gal 4 *upstream activating sequence*.

Aufgrund der Größe (242 AS, 27 kDa) und des pI (6.77) wurde angenommen, dass ORF *PA1165* für eine Sfp-Typ PPTase kodiert. Daher wurde erwartet, dass PcpS sowohl die CP des Primärmetabolismus, als auch die des Sekundärmetabolismus modifizieren kann. Solsbacher und Mitarbeiter nutzten das *matchmaker two-hybrid system 3* (Clontech, Heidelberg), um putative Proteinsubstrate von PcpS *in vivo* zu testen (173). Dazu wurden sowohl *pchE-ArCP* als auch *pvdD1-PCP* durch PCR aus den entsprechenden pQE70-Konstrukten amplifiziert und in den pGBKT7 Vektor kloniert. *S. cerevisiae* AH109 wurde entweder mit pGADT7[*PA1165*] oder, als Kontrolle, mit dem leeren pGADT7 und mit pGBKT7[*pchE-ArCP*] oder pGBKT7[*pvdD1-PCP*] transformiert. Transformanden wurden auf Platten ohne Leucin/Tryptophan (als Kontrolle) oder auf Platten ohne Leucin/Tryptophan/Histidin/Adenin (Test auf Reportergenaktivierung) ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Als Positivkontrolle wurde *S. cerevisiae* AH109 mit pGBKT7[*p53*] und pGADT7[*SV40Tag*] transformiert. Murin p53 kodiert durch das erste und SV40 *large T-antigen* kodiert durch das zweite Konstrukt wurden aufgrund ihrer bekannten Interaktion in Hefe *two-hybrid* Systemen gewählt (174,175). Als Test auf Autoaktivierung von PcpS wurde *S. cerevisiae* AH109 mit pGBKT7[*p53*] und pGADT7[*PA1165*] transformiert. Alle Stämme konnten auf Platten ohne Leucin/Tryptophan wachsen. Dies bestätigte das Vorhandensein sowohl eines pGADT7 als auch eines pGBKT7 Konstrukts. Auf Platten die zusätzlich kein Histidin und Adenin enthielten konnte Aktivierung des Reporters (Abb. 35) in der Positivkontrolle und in Stämmen AH109-pGADT7[*PA1165*], die zusätzlich pGBKT7[*pchE-ArCP*] oder pGBKT7[*pvdD1-PCP*] trugen, beobachtet werden. Dies zeigte eine klare Interaktion zwischen PcpS und diesen beiden CP. Diese Interaktion konnte auch *in vitro* nachgewiesen werden (s. 5.2.2.2), *pvdD1-PCP* konnte jedoch in *E. coli* nicht exprimiert werden und stand daher für eine *in vitro* Charakterisierung nicht zur Verfügung. Die Negativkontrolle mit dem leeren pGADT7 als zweites Plasmid konnte, wie erwartet, nicht auf diesen Platten wachsen. Auch wurde eine Autoaktivierung von PcpS nicht beobachtet (173). Dies Experiment zeigte, dass PcpS in der Lage ist CP des Sekundärmetabolismus zu modifizieren, so wie man das von einer Sfp-Typ PPTase erwarten würde.

5.2.2.2 *In vitro* Untersuchungen mit [³H]CoA

Da PcpS die einzige PPTase von *P. aeruginosa* zu sein schien, nahem wir an, dass das Enzym auch andere CP, insbesondere das FAS ACP, modifizieren kann. Um dies zu überprüfen wurde ein Radioaktivassay verwendet. Wir gingen davon aus, dass sowohl PcpS,

als auch Sfp, alle oben beschriebenen CP modifizieren kann, wohingegen von AcpS als PPTase des Primärmetabolismus eine höhere Selektivität erwartet wurde. Es bleibt jedoch festzustellen, dass das pchE-ArCP, obwohl es normalerweise Teil einer NRPS ist, auch ein dem FAS-ACP vergleichbar saures Protein ist. Daher war das Ergebnis dieses Experiments nicht so klar, wie Abb. 36 zeigt.

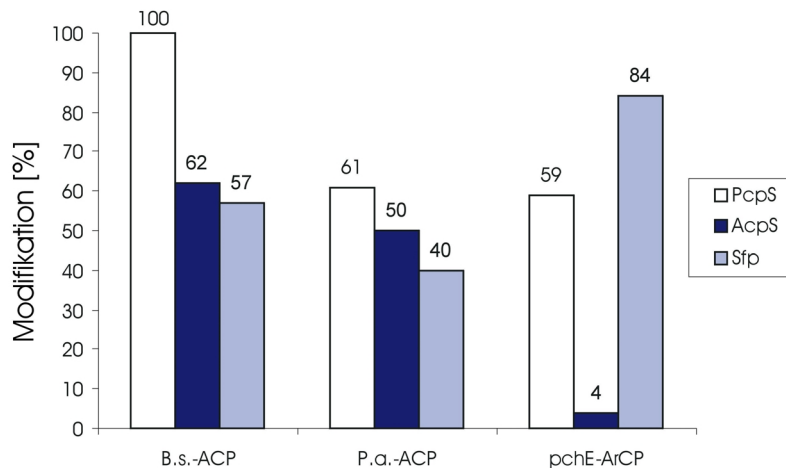


Abb. 36: Proteinpartner von PcpS, AcpS und Sfp. Die Selektivität von PcpS, AcpS und Sfp gegenüber B.s.-ACP, P.a.-ACP und pchE-ArCP wurde durch den Radioaktivassay bestimmt. Reaktionsansätze enthielten 64.1 μ M P.a.-ACP, pchE-ArCP oder B.s.-ACP, 20 μ M CoA, 200 nM [3 H]CoA, 112 nM AcpS, 120 nM Sfp oder PcpS und wurden bei pH 8.8 30 min bei 37 °C inkubiert.

Wie in Abb. 36 dargestellt, konnten PcpS und Sfp alle getesteten CP erkennen und modifizieren. AcpS hingegen modifiziert sowohl sein kognates ACP Substrat und das P.a.-ACP, nicht aber das ArCP. Dies zeigt erneut die enge Substratspezifität von AcpS und macht einmal mehr deutlich, dass AcpS nicht mit dem Sekundärmetabolismus kreuzreagiert. Obwohl dies ein rein qualitativer Assay ist, scheint AcpS P.a.-ACP in vergleichbarem Umfang wie PcpS zu modifizieren.

5.2.2.3 Biochemische Charakterisierung von PcpS

Die *in vitro* Studien konnten zeigen, dass PcpS sowohl die CP des Primär- als auch die des Sekundärmetabolismus effizient modifizieren kann. In diesem Fall gäbe es also keine Notwendigkeit für eine weitere, AcpS-Typ, PPTase in *P. aeruginosa*. Der nächste Schritt war demnach die quantitative Erfassung der biochemischen Daten zur Modifikation der CP durch PcpS.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die HPLC-Methode angepasst, um P.a.-ACP und pchE-ArCP in ihre *apo*- und *holo*-Form zu trennen, wie in Abb. 37 am Beispiel von P.a.-ACP gezeigt. Nach der heterologen Expression der CP in *E. coli* war das *apo*- zu *holo*-Verhältnis wie folgt: P.a.-ACP: 66 zu 34%; pchE-ArCP: 100 zu 0%; B.s.-ACP: 92 zu 8%; TycC3-PCP: 95 zu 5%.

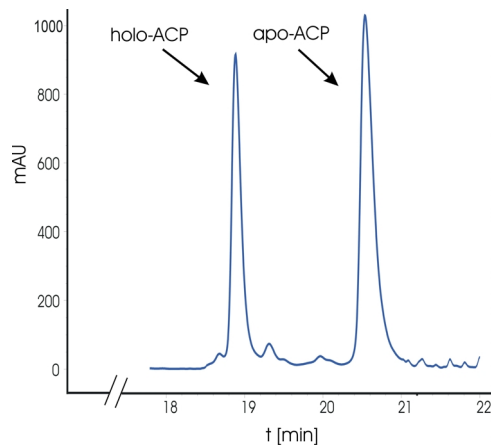


Abb. 37: Trennung von P.a.-ACP in seinen *apo*- und *holo*-Form. Dargestellt ist ein Lauf auf einer analytischen *reversed phase* C₁₈-HPLC-Säule unter Zugabe von P.a.-ACP vor der Modifikation durch eine PPTase.

Vor der Charakterisierung von PcpS mit den Proteinsubstraten wurde das pH Profil von PcpS bestimmt. Dazu wurden MES/NaAc Puffer zwischen pH 4.5 und 6.5 sowie Tris/HCl-Puffer für pH-Werte von 7.0-9 verwendet und die Menge an gebildetem *holo*-P.a.-ACP mit der HPLC-Methode bestimmt. Die Reaktionsansätze enthielten außerdem 36 μ M *apo*-P.a.-ACP, 5.15 nM PcpS und 500 μ M CoA. Anschließend wurden die berechneten Geschwindigkeitswerte gegen den verwendeten pH-Wert aufgetragen. Wie in Abb. 38 gezeigt, hat PcpS ein deutliches pH-Optimum bei pH 6.5 mit P.a.-ACP, wobei die Aktivität bei pH 7 bereits auf 62%, bei pH 5 sogar auf 27% sinkt. Dieser pH-Wert wurde daher für alle weiteren Charakterisierungen gewählt.

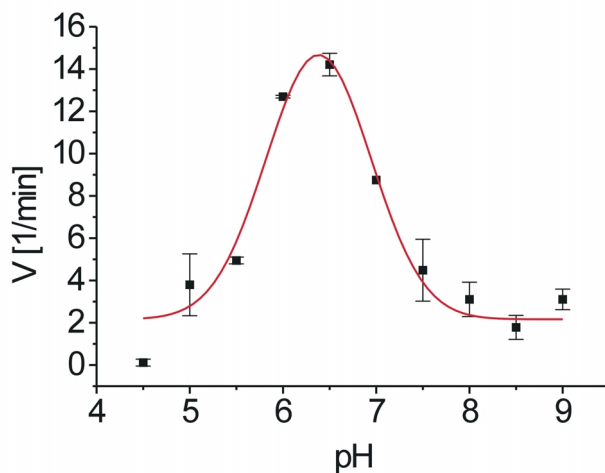


Abb. 38: pH Profil von PcpS. Die PPTase Aktivität wurde durch den HPLC Assay bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Reaktionsansätze enthielten 36 μ M *apo*-P.a.-ACP, 5.15 nM PcpS, 500 μ M CoA sowie 75 μ M Puffer und wurden 10 min bei 37 °C inkubiert. Für pH-Werte zwischen 4.5-6.5 wurde MES/NaAc Puffer verwendet, wohingegen für pH-Werte zwischen pH 7.0-9 Tris/HCl-Puffer benutzt wurden.

Kinetische Konstanten wurden durch eine Anpassung der experimentellen Daten an eine hyperbolische Michaelis-Menten Gleichung bestimmt. Die kinetischen Konstanten finden sich in Tab. 19. Zunächst wurde der K_m von PcpS für CoA bestimmt. Dazu wurde die Konzentration von CoA zwischen 1-500 μ M variiert, die ACP Konzentration hingegen bei 200 μ M konstant gehalten. Der Sättigungsbereich wurde jedoch schon bei 5 μ M CoA, erreicht wohingegen bei höheren Konzentrationen eine Inhibierung auftrat (Abb. 39). Wurden die

Geschwindigkeitswerte zwischen 0.5 und 5 μM CoA zur K_m -Wert Bestimmung verwendet, so zeigte das Enzym normales Michaelis-Menten Verhalten. In allen weiteren Kinetikmessungen wurde die CoA Konzentration daher bei 5 μM konstant gehalten. Die Michaelis Konstante für CoA Konzentrationen zwischen 0.5-5 μM war 1.1 ± 0.3 , der k_{cat} -Wert $168 \pm 13.8 \text{ min}^{-1}$. Dies ist das erste Mal, dass für CoA ein inhibitorischer Effekt auf eine PPTase nachgewiesen werden konnte. Weder *B. subtilis* AcpS noch Sfp oder *E. coli* AcpS zeigen ein ähnliches Phänomen (23,72,94).

Die hier mit CoA bestimmten K_m - und k_{cat} -Werte sind denen, die für Sfp bestimmt wurden sehr ähnlich

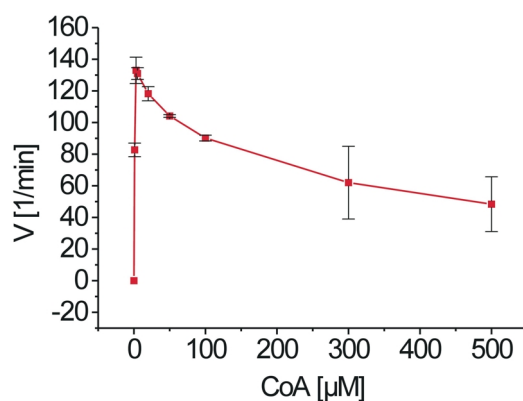


Abb. 39: Inhibierung von PcpS durch hohe CoA Konzentrationen. Reaktionsansätze enthielten 200 μM P.a.-ACP, 5.15 nM PcpS und CoA Konzentrationen von 1-500 μM . Die Ansätze wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert und die Menge an gebildetem *holo*-P.a.-ACP wurde mit der HPLC-Methode bestimmt.

Wie schon zuvor für *B. subtilis* FAS ACP gezeigt werden konnte, wurden auch für P.a.-ACP mit PcpS zwei K_m - und k_{cat} -Werte bestimmt. Diese Abweichung vom normalen Michaelis-Menten Verhalten wurde zuerst für AcpS von *Streptococcus pneumoniae* bestimmt und konnte von mir auch für *B. subtilis* AcpS und Sfp bestätigt werden (s. 5.1.3.2). Zur Bestimmung des K_m - und k_{cat} -Werts von PcpS für P.a.-ACP wurde *apo*-P.a.-ACP in Konzentrationen von 1.6-12.5 bzw. 23-234 μM eingesetzt. Für den ersten Konzentrationsbereich war der K_m $1.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$, der k_{cat} $35.7 \pm 2.1 \text{ min}^{-1}$, für den zweiten $60.4 \pm 10.3 \mu\text{M}$ mit einem k_{cat} von $154.7 \pm 9.3 \text{ min}^{-1}$. Diese Werte sind gut mit denen vergleichbar, die AcpS für sein kognates ACP hat, wohingegen die gleichen K_m -Werte von Sfp um einen Faktor 4.2 bzw. 1.8 erniedrigt sind (Tab. 19, 20) und die k_{cat} -Werte gleichzeitig 13-fach bzw. 10-fach niedriger sind, als für die für PcpS und AcpS. Neben dem kognaten, P.a.-ACP wurde auch B.s.-ACP und pchE-ArCP zur Charakterisierung herangezogen. Für beide Substrate konnten ebenfalls zwei K_m und k_{cat} bestimmt werden. Im Falle des B.s.-ACP war dies nicht überraschend, ArCP sind jedoch normalerweise Teil eines NRPS Systems und dies wurde bisher noch mit keiner anderen PPTase beobachtet. Im Vergleich der Modifikation von CP des Sekundärmetabolismus durch Sfp sind die k_{cat} -Werte von PcpS für pchE-ArCP

niedrig (0.9 und 6.5 min^{-1} für pchE-ArCP Konzentrationen zwischen 1 - 10 bzw. 21 - $155 \text{ }\mu\text{M}$). So ist z.B. der k_{cat} von Sfp für apo-EntB-ArCP (23) 10-mal höher und liegt bei 65 min^{-1} .

PcpS modifiziert auch das nicht-kognate B.s.-ACP. Obwohl der K_m für niedrige apo-B.s.-ACP Konzentrationen (2.2 - $25 \text{ }\mu\text{M}$) um den Faktor 12 erhöht ist im Vergleich zu P.a.-ACP, ist der K_m ($37.8 \text{ }\mu\text{M}$) für Konzentrationen zwischen 25 - $206 \text{ }\mu\text{M}$ 1.8-mal niedriger verglichen mit seinem kognaten ACP. Die k_{cat} -Werte sind etwa doppelt so hoch bzw. 0.9-mal so hoch (50.9 bzw. 108.3 min^{-1}), bei niedrigen bzw. hohen apo-B.s.-ACP Konzentrationen. P.a.-ACP (59% Identität mit B.s.-ACP) scheint also kein Spezialfall zu sein, vielmehr ist die katalytische Effizienz von PcpS mit diesem nicht-kognaten ACP ist nur geringfügig niedriger (Tab. 20).

Überraschender Weise konnten auch für apo-TycC3-PCP zwei K_m - und k_{cat} -Werte bestimmt werden. Ein erster Sättigungsbereich wurde für apo-TycC3-PCP Konzentration von 1 - $10 \text{ }\mu\text{M}$ erreicht, wobei der K_m $1.1 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{M}$, der k_{cat} 0.6 min^{-1} betrug. Oberhalb $25 \text{ }\mu\text{M}$ apo-TycC3-PCP begannen die Geschwindigkeitswerte wieder zu steigen und erreichten ein zweites Plateau bei $150 \text{ }\mu\text{M}$. Der zweite K_m betrug 66.8 ± 3.7 , der k_{cat} $3.0 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$. Wie schon im Falle des pchE-ArCP waren besonders die k_{cat} -Werte von PcpS für TycC3-PCP ungewöhnlich niedrig für eine Sfp-Typ PPTase, wohingegen der zweite K_m -Wert vergleichsweise hoch ist. Zum Vergleich: Die entsprechenden Werte von Sfp für TycC3-PCP betragen $4.5 \text{ }\mu\text{M}$ und 96 min^{-1} .

Tabelle 19: Kinetische Konstanten von PcpS, AcpS und Sfp

Substrat	K_m [μM]			k_{cat} [min^{-1}]		
	PcpS	AcpS	Sfp	PcpS	AcpS	Sfp
apo-P.a.-ACP (1.6 - $12.5 \text{ }\mu\text{M}$)	1.1 ± 0.3	^a n.b.	n.b.	35.7 ± 2.1	n.b.	n.b.
apo-P.a.-ACP (23 - $234 \text{ }\mu\text{M}$)	60.4 ± 10.3	n.b.	n.b.	154.7 ± 9.3	n.b.	n.b.
apo-B.s.-ACP (2.2 - $25 \text{ }\mu\text{M}$)	5.9 ± 1.1	0.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	50.9 ± 3.2	^e 22 ± 2	1.7 ± 0.1
apo-B.s.-ACP (25 - $206 \text{ }\mu\text{M}$)	37.8 ± 6	68 ± 11	38 ± 8	108.3 ± 5	^e 125 ± 9	12.5 ± 1
apo-TycC3-PCP (0.9 - $12 \text{ }\mu\text{M}$)	1.1 ± 0.2	^b nbb.	nbb.	0.6 ± 0	nbb.	nbb.
apo-TycC3-PCP (25 - $150 \text{ }\mu\text{M}$)	66.8 ± 3.7	nbb.	^c 4.5 ± 1	3.0 ± 0.1	nbb.	^c 96 ± 4
apo-pchE-ArCP (1 - $10 \text{ }\mu\text{M}$)	0.8 ± 0.1	nbb.	n.b.	0.9 ± 0	nbb.	n.b.
apo-pchE-ArCP (21 - $155 \text{ }\mu\text{M}$)	50.3 ± 1.4	nbb.	n.b.	6.5 ± 0.1	nbb.	n.b.
CoA ^f (1 - $5 \text{ }\mu\text{M}$)	1.1 ± 0.3	^e 5.4 ± 1.5	^d 0.7	168.9 ± 13.8	^e 109 ± 4.8	^d 102

^a n.b.: Nicht bestimmt, ^b nbb. : Nicht bestimmbar, ^c Mofid *et al.* (168), ^d Quadri *et al.* (23), ^e Finking (92), ^f 1 - $500 \text{ }\mu\text{M}$ im Fall von AcpS, 0.5 - $50 \text{ }\mu\text{M}$ im Fall von Sfp

Tabelle 20: Katalytische Effizienz von PcpS, AcpS und Sfp

Substrat	k_{cat}/K_m [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]		
	PcpS	AcpS	Sfp
<i>apo</i> -P.a.-ACP (1.6-12.5 μM)	32.5	n.b.	n.b.
<i>apo</i> -ACP (23-234 μM)	2.6	n.b.	n.b.
<i>apo</i> -B.s.-ACP (2.2-25 μM)	8.6	110	1.2
<i>apo</i> -B.s.-ACP (25-206 μM)	2.9	1.8	0.3
<i>apo</i> -TycC3-PCP (0.9-12 μM)	0.5	nbb.	nbb.
<i>apo</i> -TycC3-PCP (25-150 μM)	0.04	nbb.	21.6
<i>apo</i> -pchE-ArCP (1-10 μM)	1.1	nbb.	n.b.
<i>apo</i> -pchE-ArCP (21-155 μM)	0.13	nbb.	n.b.

5.2.2.4 Der Aggregationszustand von PcpS

Der Nachweis, ob es sich bei PcpS, wie bei Sfp, um ein Monomer oder eventuell höheres Aggregat handelt, erfolgte mit einer kalibrierten Gelfiltrationssäule. Zur Kalibrierung wurden Aprotinin (6.5 kDa), Cytochrom c (12.4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Ei-Albumin (45 kDa) wie unter 4.2.5 beschrieben verwendet. Das Totvolumen (V_0) der Säule wurde mit Ferritin (450 kDa) bestimmt. Die Retentionszeit (V) der Proteine wurde gemessen, anschließend V/V_0 gegen $\log(\text{kDa})$ aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet (Abb. 40). Das V/V_0 des PcpS-His₆, das von derselben Säule eluiert wurde, war 1.704. Dies deutet auf ein apparentes Molekulargewicht von 27 kDa hin, was der Größe der monomeren His₆-Fusionsproteins entspricht (berechnete Größe: 27.8 kDa).

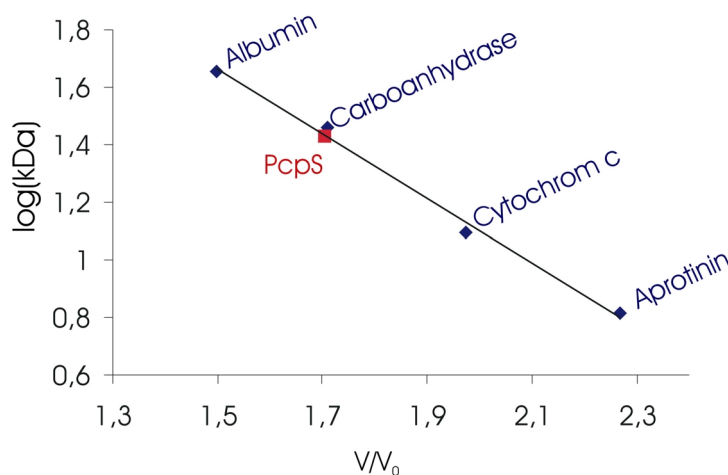


Abb. 40 Größenbestimmung von PcpS. Eine Gelfiltrationssäule wurde mit den Proteinen Aprotinin, Cytochrom c, Carboanhydrase und Albumin und Ferritin kalibriert, indem die V/V_0 der Proteine gegen ihre Größe in $\log(\text{kDa})$ aufgetragen wurde. PcpS wurde von der gleichen Säule eluiert und durch die berechnete Ausgleichsgerade auf seine apparente Größe zurückgerechnet.

5.2.2.5 Deletion von PA1165

Um die *in vivo* Rolle von PcpS im Hinblick auf die Modifikation des FAS ACP und des Siderophormetabolismus näher zu untersuchen, wurde eine Deletion des zugehörigen Gens, *PA1165*, vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das auf dem pEX18Ap *Suicidevektor* basierende Deletionssystem verwendet, das schon zuvor erfolgreich genutzt wurde (143). In diesem Vektor ist das *PA1165* Gen durch eine Gentamycin Resistenzkassette ersetzt. Die Kassette wird von zwei jeweils etwa 1 kb Fragmenten homologer DNA flankiert (Abb. 41 A). Außerdem enthält der Vektor eine Ampicillin/Carbenicillin Resistenzkassette und das *sacB* Gen für die Gegenselektion auf einen durch Singlecrossover chromosomal integrierten Vektor (Abb. 41 B). Das *sacB* Gen kodiert für die Levansucrase, die Sucrose in ein Fructosepolymer umwandelt, was auf bisher ungeklärte Weise zum Tod des Bakteriums führt (s. 4.1.7).

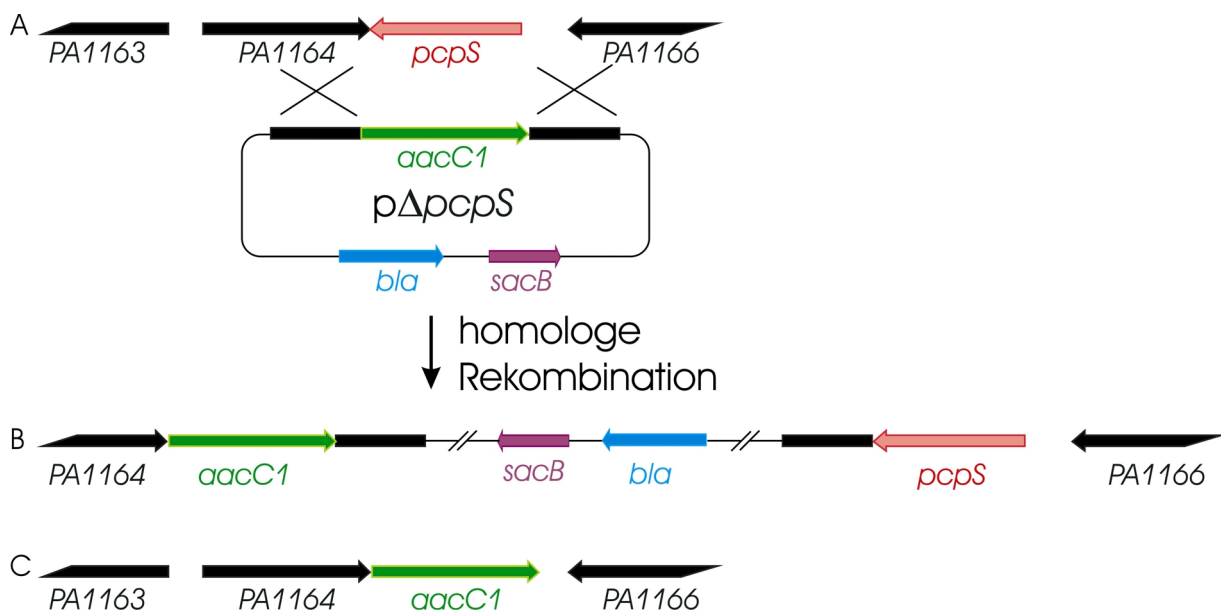


Abb. 41: Deletion des für PcpS kodierenden PA1165. **A.** Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Genom von *P. aeruginosa*, der das *PA1165* enthält und der Vektor *pΔpcpS* mit den homologen Bereichen und der Gentamycin Resistenzkassette (*aacC1*), die das *PA1165* ersetzt. Außerdem enthält der Vektor eine Ampicillin Resistenzkassette und das *sacB* zur Gegenselektion auf Singlecrossover. **B.** Genom nach Singlecrossover. Der gesamte Vektor ist in integriert worden. Solche Kolonien sollten gentamycin- und ampicillinresistent sein. Ihr Genom enthält nicht nur das noch intakte *PA1165*, sondern auch das *sacB* Gen, dessen Genprodukt, die Levansucrase, auf sucrorehaltigem Medium zum Tod der Bakterien führt. **C.** Nach einem Doppelscrossover wurde das *PA1165* Gen durch die Gentamycin Resistenzkassette ersetzt.

M. Schobert (TU Braunschweig) konnte mit dem von mir klonierten *pΔpcpS* Konjugationsexperimente mit *P. aeruginosa* durchführen. Nach der Konjugation isolierte er mehrere Hundert gentamycinresistente Kolonien. Von diesen wurden 50 zur weiteren Analyse herangezogen, die sich als carbenicillinresistent erwiesen, was in allen Fällen auf einen Singlecrossover hinweist. Durch PCR wurde die Anwesenheit der Gentamycinkassette, die

das *PA1165* Gen ersetzt, und des Wildtyp *PA1165* in zehn Mutanten nachgewiesen. PCR und Restriktionsanalyse (s. 4.1.7) bestätigten die Anwesenheit von sowohl dem Wildtyp, als auch dem durch die Gentamycinkassette unterbrochenen Gen in allen getesteten Stämmen. Der gesamte *Suicidevektor* war offenbar durch Singlecrossover, wie in 41 B zu sehen, in das Genom integriert worden. Daher waren die Mutanten auch, wie erwartet, sucrosesensitiv. Potentielle Doppelcrossover Mutanten wurden auf sucrose- und gentamycinhaltigem LB Medium selektiert. Von den 10 ursprünglich sucrosesensitiven Mutanten wurden auf diese Weise Mutanten isoliert, die spontan sucrose- und gentamycinresistent waren. Als weiteres Indiz auf möglichen Doppelcrossover durch Verlust des Vektors hatten die isolierten Mutanten auch ihre Carbenicillinresistenz verloren (s. Abb. 41 C). Diese Befunde sprechen für einen Austausch des Wildtyp Gens durch die Gentamycin Resistenzkassette. Die PCR und Restriktionsanalyse konnte jedoch die Anwesenheit von sowohl dem Wildtyp, als auch dem mutierten *PA1165* Gen in allen Mutanten nachweisen. Das Ergebnis dieses Experiments ist ein starker Indikator, dass das *PA1165* Gen für das Wachstum von *P. aeruginosa* essentiell ist und nicht deletiert werden kann.

Bevor der Vektor *pΔpcpS* in *P. aeruginosa* eingesetzt wurde, wurde seine Integrität von mir, außer durch Restriktionsverdau, auch in *E. coli* überprüft. Dazu wurde *E. coli* XL10Gold mit dem Vektor transformiert und dieser Stamm anschließend auf ampicillin- und gentamycinhaltigem oder ampicillin- und sucrosehaltigem LB Medium ausgestrichen. Zur Kontrolle wurde der gleiche *E. coli* Stamm mit *pQE30[acpS]* transformiert und ebenso ausgestrichen (Abb. 42).

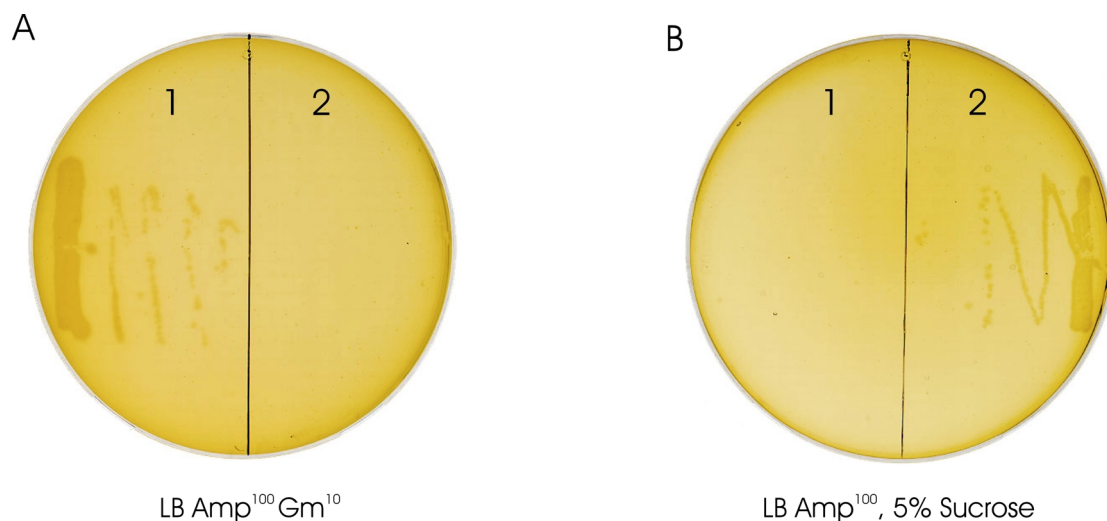


Abb. 42: Funktionsfähigkeit des *pΔpcpS* Vektors in *E. coli*. *E. coli* XL10Gold wurde mit *pΔpcpS* (1) oder als Kontrolle mit *pQE30[acpS]* (2) transformiert und sowohl auf **A.** ampicillin-/gentamycinhaltigem, als auch auf **B.** ampicillinhaltigem LB Medium mit 5% Sucrose ausgestrichen. Erwartungsgemäß wächst *E. coli*-*pQE30[acpS]* auf LB mit Ampicillin und Sucrose, jedoch nicht, wenn Gentamycin zugegen ist. *E. coli*-*pΔpcpS* wächst wie erwartet auf LB mit Ampicillin und Gentamycin, jedoch nicht, wenn Sucrose enthalten ist.

Erwartungsgemäß konnte *E. coli*-pQE30[*acpS*] auf LB Medium, dem Ampicillin und Sucrose beigegeben wurde, wachsen (Abb. 42 B). Der Stamm wächst jedoch aufgrund der fehlenden Gentamycinresistenz nicht auf ampicillin- und gentamycinhaltigem LB Medium (Abb. 42 A). *E. coli*-pΔ*pcpS* ist sowohl gentamycin-, als auch ampicillinresistent und wächst daher auf einer ampicillin-/gentamycinhaltigen LB Platte (Abb. 42 A). Da der Vektor das *sacB* Gen enthält stirbt der Stamm jedoch, wenn er auf sucrosehaltigem LB ausgestrichen wird (Abb. 42 B).

5.2.2.6 Gene Silencing von PA1165

Neben der Deletion von Genen gibt es auch die Möglichkeit die Genexpression durch sog. antisense-RNA zu kontrollieren (s. 4.1.5). Dazu wurden von mir zwei Vektoren, pSYN*pcpS* und pANTI*pcpS* konstruiert. Diese Vektoren beinhalten ein 100 bp großes Fragment, das sich aus 80 bp des *PA1165* Gens und 20 bp stromaufwärts des Start GTG zusammensetzt (Abb. 43). Die konstruierten Vektoren beinhalten diese Fragment in unterschiedlicher Orientierung, sodass die mRNA, die von pSYN transkribiert wird in gleicher Orientierung vorliegt, wie diejenige, die von *PA1165* selbst transkribiert wird. Die von pANTI produzierte RNA ist sog. antisense-RNA. Diese antisense-RNA kann *in vivo* mit der Translation interferieren (RNAi, s. 4.1.5). Durch Bindung der antisense-RNA an die mRNA von *PA1165* entsteht dsRNA. Diese dsRNA wird anschließend von der RNase III abgebaut und es kann zu einem veränderten Phänotyp kommen.

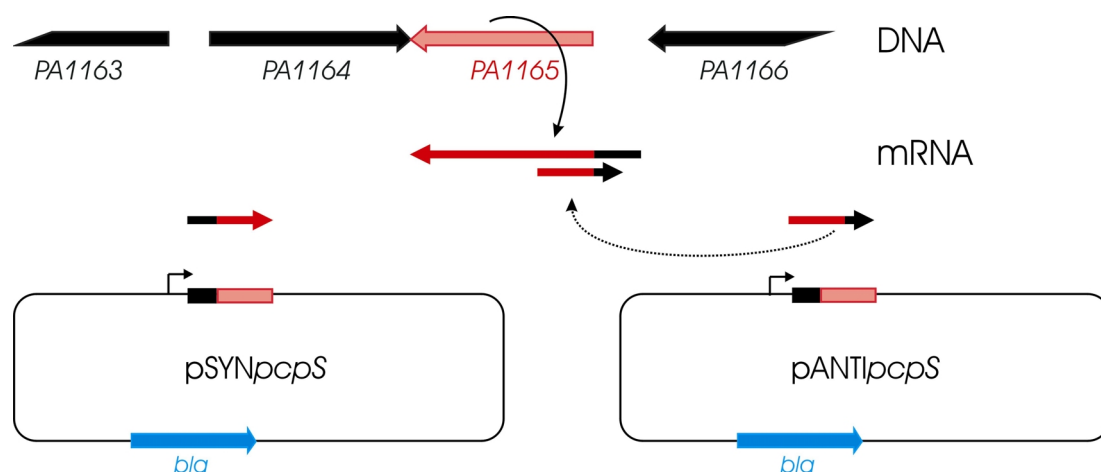


Abb. 43 Silencing des *PA1165* Gens. Die beiden Vektoren *pSYNpcpS* und *pANTIpcpS* sorgen *in vivo* für die Produktion von RNA in gleicher bzw. komplementärer Orientierung zur mRNA, die von *PA1165* transkribiert wird. Eine Interferenz von komplementärer antisense RNA führt zur Verschlechterung der Translation und es kann eventuell ein veränderter Phänotyp beobachtet werden.

M. Schobert hat das Experiment mit den von mir konstruierten Vektoren durchgeführt. Abb. 44 zeigt die Wachstumskurven des *P. aeruginosa* Wildtyps (ADD 1976) sowie die *Pseudomonas* Stämme, die entweder das pSYN oder das pANTI Plasmid tragen. Die Transkription wurde durch IPTG Zugabe bei einer A_{578} von 0.5 induziert, zur Kontrolle sind die Stämme auch in nicht induziertem Zustand vermessen worden.

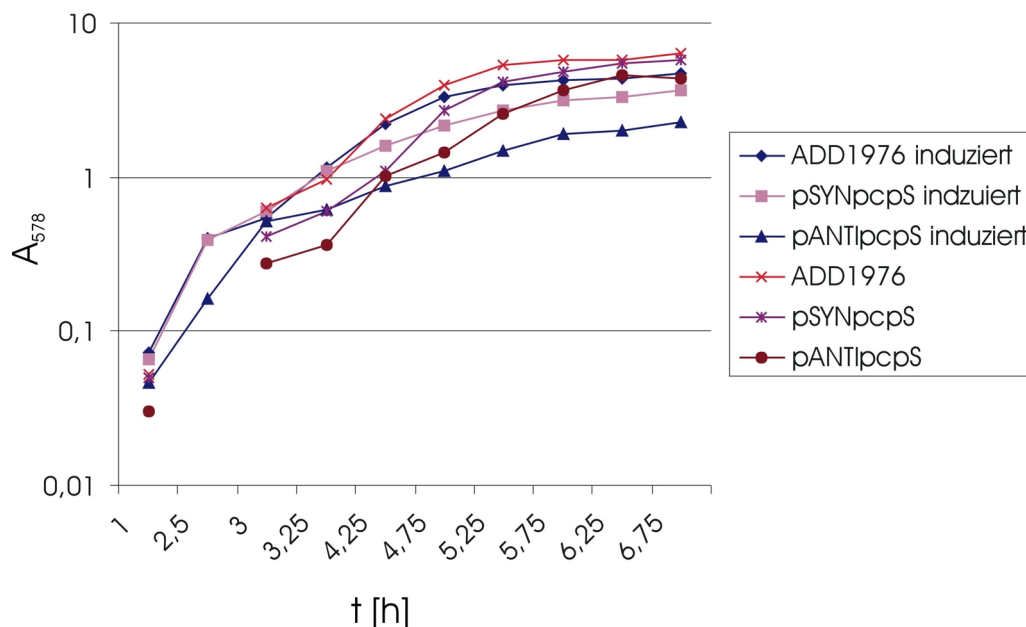


Abb. 44: Wachstumskurven verschiedener *P. aeruginosa* Stämme. Gezeigt sind, jeweils induziert und nicht induziert, der Wildtyp (ADD1976) sowie Stämme, welche die Plasmide pSYNpcpS und pANTIpcpS tragen. Wie erwartet wächst der Wildtyp am besten, dicht gefolgt von dem Stamm, der das induzierte SYN-Konstrukt trägt sowie dem induzierten Wildtyp und dem Stamm, der das nicht induzierte pANTI Konstrukt trägt. Wie erwartet wächst der Stamm, der das induzierte pANTI Plasmid trägt am schlechtesten.

Erwartungsgemäß wächst der Stamm, der das induzierte pANTIpcpS trägt am langsamsten, wohingegen der Wildtyp am schnellsten wächst. Der Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Stämmen, welche die nicht induzierten Plasmide pSYN, pANTI oder das induzierte pSYN tragen, sowie dem Wildtyp mit IPTG ist nicht groß, wie erwartet. Obwohl der Effekt insgesamt nicht sehr groß ist, deuten die Ergebnisse dennoch darauf hin, dass die von pANTIpcpS (unter induzierten Bedingungen) transkribierte RNA negativ in die Expression von *Pil165* eingreift, was einen weiteren Hinweis darauf liefert, dass PcpS für *P. aeruginosa* essentiell ist.

5.2.2.7 Inhibierung von PcpS in vitro

Da für Sfp gezeigt werden konnte, dass auch CoA Derivate als Substrat akzeptiert werden, untersuchten wir die Frage, ob ein nicht hydrolysierbares CoA Derivat als Inhibitor

von PcpS in Frage käme. Dazu wurde α,β -Methylenadenosin-5'-diphosphat (MADP) gewählt (Abb. 45 A). In diesem CoA Derivat ist in der Bindung, die während der PPTasen katalysierten Reaktion gespalten, der Brückensauerstoff zwischen α - und β -Phosphat durch eine Methylengruppe ersetzt, allerdings fehlt das 4'PP. Daher wurde angenommen, dass dieses Analogon diese Reaktion blockieren kann. Um dies zu testen wurde die Menge an gebildetem *holo*-P.a.-ACP durch HPLC Analyse bestimmt. Die Reaktionsansätze enthielten u.a. 686 nM PcpS, 7 μ M *apo*-P.a.-ACP und 5 μ M CoA oder zusätzlich 5 μ M MADP und wurden 17 min bei 37 °C inkubiert. Kontrollreaktionen enthielten nur CoA oder nur MADP.

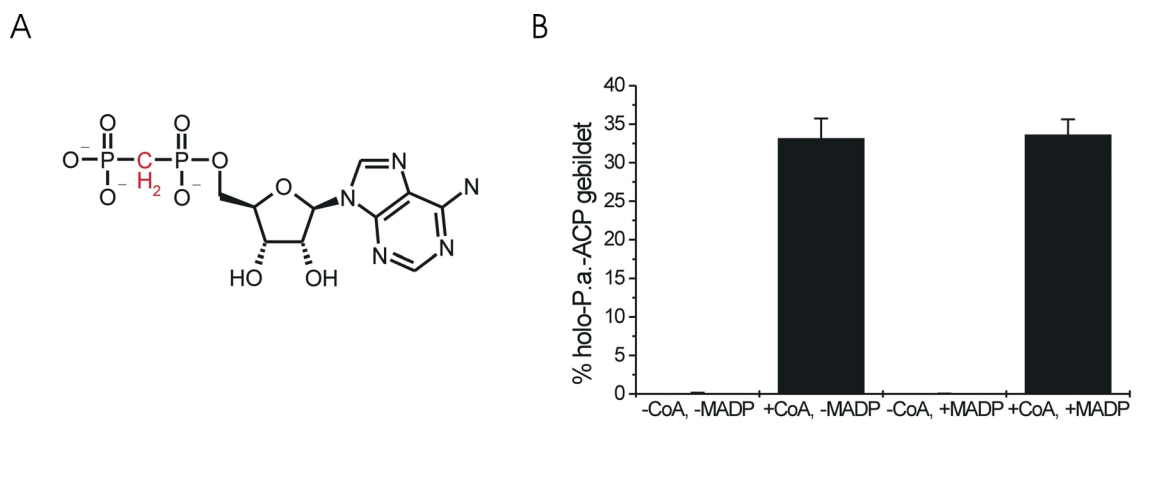


Abb. 45: Inhibitorstudien an PcpS. **A.** α,β -Methylenadenosin-5'-diphosphat (MADP) stellt ein nicht hydrolysierbares Analogon von CoA (ohne 4'PP) dar. **B.** In Reaktionsansätzen mit 686 nM PcpS, 7 μ M P.a.-ACP und 5 μ M CoA oder zusätzlich 5 μ M MADP wurde der Effekt des potentiellen Inhibitors getestet. In Reaktionsansätzen, die entweder kein CoA (-CoA) oder nur MADP (+MADP) enthielten, wurde erwartungsgemäß kein *holo*-ACP gebildet. In Reaktionen, die nur CoA oder zusätzlich MADP enthielten wurde allerdings die gleiche Menge *holo*-ACP gebildet.

Abb. 45 B zeigt, dass Reaktionen, in denen kein CoA oder nur MADP enthalten war, wie erwartet nicht zur Bildung von *holo*-ACP führen. Allerdings inhibiert MADP die PPTasen katalysierte Reaktion nicht. Dies wird deutlich in den Ansätzen, die neben CoA zusätzlich MADP in gleicher Konzentration enthielten. Hier ist die Menge an gebildetem *holo*-ACP gleich hoch.

5.3 Inhibierung von A-Domänen

Die NRPS A-Domänen erfüllen im NRPS Synthesystem die gleiche Aufgabe wie die Aminoacyl-tRNA Synthetasen im ribosomalen Synthesystem. Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass beide Enzyme dieselbe chemische Reaktion katalysieren und der Reaktionsmechanismus sich ähnelt (107,111). Die Energie für die Aminoadenylatbildung wird in beiden Fällen durch Hydrolyse von ATP gewonnen, das damit als eines der beide

Substrate fungiert. Am Beispiel der tRNA-Synthetasen konnte gezeigt werden, dass dieser Schritt effektiv durch nicht hydrolysierbare Analoga, sog. Sulfamoyl Derivate inhibiert werden können (s. Einleitung). In neuere Untersuchungen von Neumüller und Mitarbeiter (85,176) wurde diese Strategie verwendet, um mit den entsprechenden Analoga die Katalyse der NRPS-A-Domänen zu hemmen.

5.3.2 Inhibierung von DltA

DltA ist ein Enzym des Primärmetabolismus von *B. subtilis*, das D-Ala ähnlich einer A-Domäne als Aminoacyladenylat aktiviert und anschließend auf das DCP lädt. Aufgrund der Ähnlichkeit in der katalysierten Reaktion lag die Vermutung nahe, dass auch für DltA ein Inhibitor ähnlich denen für tRNA-Synthetasen synthetisiert werden kann. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Nina Bandur (AK Prof. Dr. Koert, Philipps-Universität Marburg) sowie Dr. Jürgen May und Dr. Thomas Weber aus unserer AG durchgeführt. Für das Verständnis wichtige Ergebnisse, die N. Bandur und J. May erhalten haben sind hier ebenfalls aufgeführt und entsprechend gekennzeichnet.

5.3.2.1 Charakterisierung von DltA

Zunächst wurde DltA hinsichtlich seiner AS Selektivität, seines K_m für D-Ala sowie K_m und k_{cat} für DCP eingehend charakterisiert. Anschließend konnte DltA mit dem 5'-O[N-(D-alanyl)-sulfamoyl] Adenosin Inhibitor charakterisiert werden, der sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* auf seine Funktionalität getestet wurde. *dltA* wurde von Th. Weber kloniert, exprimiert und hinsichtlich seiner Selektivität gegenüber D-Ala biochemisch charakterisiert. Es wurde neben einer hohen Selektivität gegenüber D-Ala nur eine leichte Seitenselektivität für D-Abu festgestellt. J. May konnte einen K_m von DltA für D-Ala von $13.62 \pm 3.9 \mu\text{M}$ ermitteln, der im gleichen Bereich liegt, wie im Fall anderer A-Domänen mit ihren kognaten AS Substraten.

Der nächste Schritt in der Reaktionsabfolge ist die Beladung des korrespondierenden CP durch DltA. Um die Beladung von DCP zu quantifizieren, wurde die Konzentration von *holo*-DCP im Bereich von 0.1 bis 10 μM variiert während die D-Ala Konzentration bei 130 μM konstant gehalten wurde. Die Konzentration von DltA betrug 200 nM. DltA erfährt Substratinhibierung, sobald die Konzentration von DCP oberhalb von 10 μM liegt. Daher konnte bei höheren Substratkonzentration nicht gemessen werden (Abb. 46 A). Der K_m -Wert von DltA für DCP betrug $8.04 \pm 1.73 \mu\text{M}$, der k_{cat} $48\,949 \pm 5983 \text{ min}^{-1}$. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz ist mit $6\,088 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ bzw. $1.01 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$ im

Bereich diffusionskontrollierter Reaktionen (1), d.h. DltA ist, katalytisch gesehen, ein perfektes Enzym.

Wir konnten außerdem beobachten, dass DltA auch B.s.-ACP belädt. Dieser Vorgang ist *in vivo* nicht sinnvoll und wird wahrscheinlich durch die Thioesteraseaktivität von DltD kontrolliert (s. Einleitung). Ein qualitativer Assay mit Reaktionsansätzen, die 108 μM *holo*-DCP oder 34 μM *holo*-B.s.-ACP und 500 nM dltA enthielten und 15 min bei 37 °C inkubiert wurden, konnte 19.3% Modifikation im Fall von DCP und 10.2% bei B.s.-ACP nachweisen (Abb. 46 B). Dieser Assay wies schon auf eine Präferenz von DltA hinsichtlich DCP hin. Um die Modifikation von B.s.-ACP durch DltA biochemisch genauer zu untersuchen, wurden Reaktionsansätze mit 0.19-119.5 μM *holo*-B.s.-ACP, 600 nM DltA und 130 μM D-Ala eine min bei 37 °C inkubiert. Der K_m -Wert konnte allerdings nicht bestimmt werden, da der Sättigungsbereich auch bei 119.5 μM *holo*-B.s.-ACP nicht erreicht werden konnte. Der abgeschätzte K_m -Wert liegt im mM Bereich, was auf eine deutliche Bevorzugung von DCP gegenüber ACP durch DltA hindeutet.

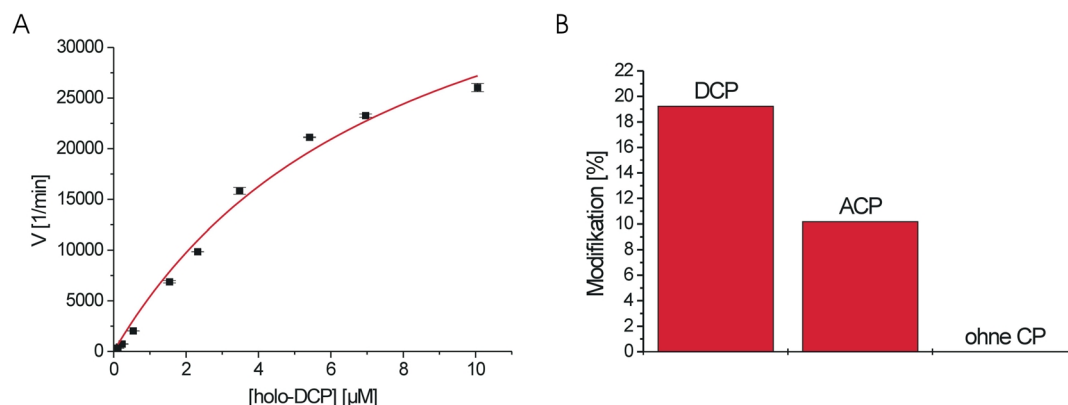


Abb. 46: Bestimmung des K_m von DltA für DCP und Modifikation von ACP. A. Der K_m von DltA für DCP wurde durch Variation der DCP Konzentration zwischen 0.1 und 10 μM bestimmt und beträgt $8.04 \pm 1.73 \mu\text{M}$, der k_{cat} $48\,949 \pm 5983 \text{ min}^{-1}$. B Der qualitative Test mit 108 μM *holo*-DCP oder 34 μM *holo*-B.s.-ACP

5.3.2.2 Inhibierung von DltA *in vitro*

Für die Inhibierung von DltA wurde das D-Ala Derivat der unter 2.3.3 vorgestellten Aminoacyl-Sulfamoyl Adenylat Analoga verwendet. Die Synthese erfolgte durch N. Bandur. Die Bestimmung des K_i -Werts von DltA für diesen Inhibitor wurde von J. May durchgeführt. Dabei wurde die Inhibitorkonzentration im ATP/PP_i-Austauschassay im Bereich von 50-400 nM bei drei verschiedenen D-Ala Konzentrationen ($K_m/2$, K_m und $10 K_m$) variiert. Die auf diese Weise erhaltenen DPM wurden reziprok gegen die Inhibitorkonzentration in Dixon Plots aufgetragen und drei Ausgleichsgraden berechnet. Der K_i ergab sich aus dem

Schnittpunkt der drei Geraden und betrug 232 nM (Abb. 47). Damit liegt dieser K_i im gleichen Bereich, wie bei anderen A-Domänen.

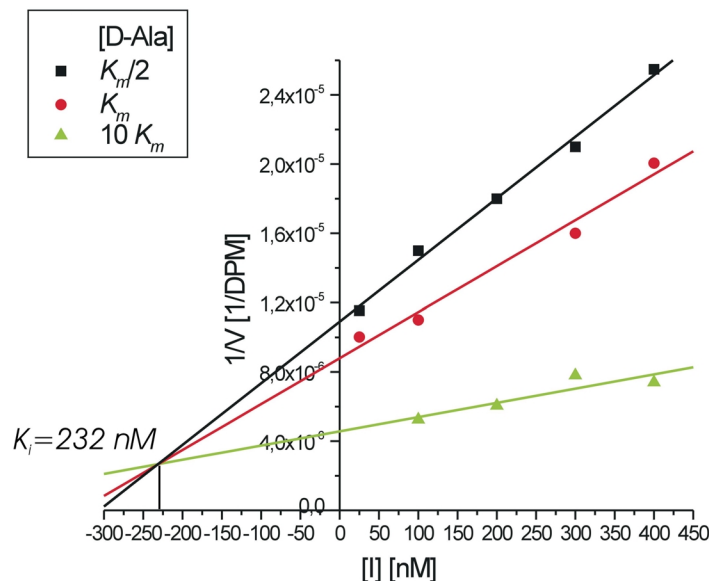


Abb. 47: Dixon Plot zur Bestimmung des K_i von DltA für den D-Ala-Sulfamoyl Adenylat-Inhibitor. Die Konzentration des Inhibitors wurde zwischen 50 und 400 nM variiert. Die D-Ala Konzentration betrug entweder $K_m/2$, K_m oder $10K_m$. Die im ATP/PP_i-Austausch erhaltenen DPM wurden reziprok gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen und für jede Substratkonzentration eine Ausgleichsgerade berechnet. Der Schnittpunkt der drei Geraden ergibt (auf die y-Achse extrapoliert) $-K_i$.

5.3.2.3 Inhibierung von DltA in vivo

Die Tatsache, dass der K_i fast 60 mal geringer war, als der K_m ermutigte uns den Effekt des Inhibitors *in vivo* zu testen. Obwohl dieses D-Ala-Sulfamoyl Adenylat nicht dafür optimiert wurde die bakterielle Zellwand zu passieren, setzten wir den Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (0-4 mM) ein und konnten damit einen wachstumshemmenden Effekt auf Gram-positive Stämme ab einer Konzentration von 2 mM nachweisen.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass *S. aureus* empfindlicher auf Vancomycin reagiert, wenn seine Zellwand nicht mit D-Ala modifiziert ist (124), und ebenso *B. subtilis* dann empfindlicher gegenüber β -Lactamantibiotika ist (129). Daher wurde der Inhibitor sowohl alleine, als auch in Verbindung mit Vancomycin an *B. subtilis* getestet. Als Kontrollstamm wurde dazu *B. subtilis* JH642 Δ dltA benutzt, der von Frank Wiegeshoff aus unserer AG konstruiert wurde. Zunächst wurde der Effekt von Vancomycin und Ampicillin auf *B. subtilis* JH642 und JH642 Δ dltA getestet (Abb. 48 A und B). Dazu wurde ein Assay mit Filterplättchen auf LB Festmediumplatten benutzt. Eine 10 mg/mL Vancomycinlösung wurde von 1-200 μ L und eine 50 mg/mL Ampicillinlösung von 0.5-10 μ L für beide Stämme variiert und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C der Hemmhof vermessen. Anschließend wurde im gleichen Assay der Inhibitor (10 mM) bei 10 μ L oder 50 μ L konstant gehalten, während die Vancomycinmenge zwischen 1-50 μ L variiert wurde (Abb. 48 C).

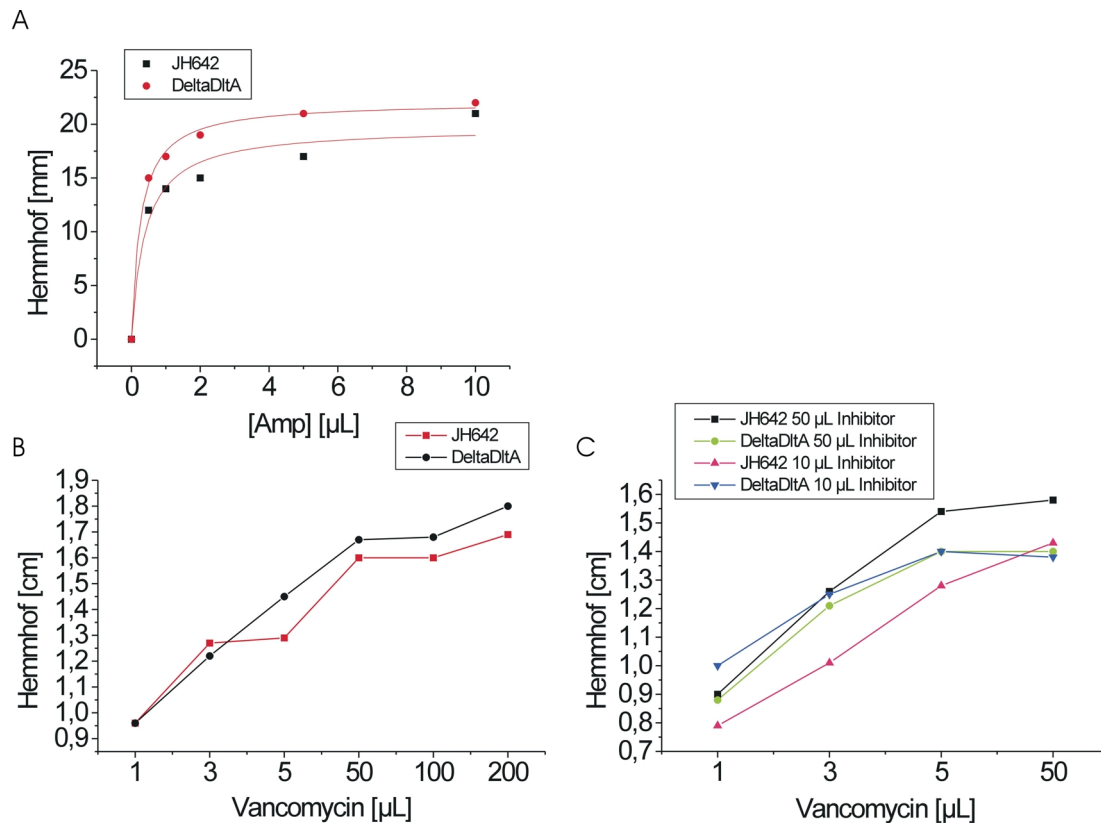


Abb. 48: Effekt von Ampicillin, Vancomycin und einer Kombination von Vancomycin und Inhibitor auf *B. subtilis* JH642 und JH642 Δ *dltA*. A. Die Menge einer 50 mg/mL Ampicillinlösung wurde von 0.5-10 μ L in Filterplättchenassays variiert und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde der Hemmhof gemessen. Erwartungsgemäß reagiert die Δ *dltA* Mutante empfindlicher auf Ampicillin genauso wie auf B. Vancomycin (10 mg/mL), das von 1-200 μ L variiert wurde. C. wird zusätzlich zu Vancomycin eine konstante (10 oder 50 μ L einer 10 mM Lösung) Inhibitormenge zugegeben, so sind alle Stämme nahezu gleich empfindlich auf Vancomycin. Der Inhibitor erzeugt also den gleich Effekt, wie die *dltA* Deletion. In allen Fällen stellen die Messpunkte den Mittelwert einer Doppelbestimmung dar. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf Fehlerbalken verzichtet.

Die *dltA* Mutante reagiert, wie erwartet, geringfügig empfindlicher auf sowohl Ampicillin, als auch Vancomycin. (Abb. 48 A und B). Die Hemmhöfe sind bei JH642 Δ *dltA* im Fall von Ampicillin um 4 mm und bei Verwendung von Vancomycin um 1-2 mm vergrößert. Wird zusätzlich zu Vancomycin eine konstante Menge an Inhibitor zugegeben, so erwartet man ab einer bestimmten Menge Inhibitor einen ähnlichen Phänotyp wie bei der Deletionsmutante, wobei diese vom Inhibitor unbeeinflusst bleiben sollte. Abb. 48 C zeigt, dass mit Ausnahme von JH642 mit 50 μ L Inhibitor alle Stämme einen einheitlichen Phänotyp zeigen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Inhibitor im Wildtyp JH642 DltA inhibiert und so den gleichen Phänotyp schafft, der durch die Deletion von *dltA* erzeugt wird.

5.4 Vorbereitung zur gerichteten Proteinevolution von A-Domänen

Eine Möglichkeit die Abfolge der AS eines NRPS Produkts zu beeinflussen ist die Veränderung der Selektivität der A-Domänen. Dazu stellte Aventis R&T linkermodifizierte Inhibitoren zur Verfügung, die auf dem Prinzip der oben beschriebenen A-Domänen- und tRNA-Synthetasen-Inhibitoren basieren. Außer der daraus resultierenden Selektionsmethode wäre auch noch eine Screeningmethode möglich. Dabei könnte entweder auf das von der A-Domäne verbrauchte ATP oder auf das gebildete Pyrophosphat gescreent werden. Um zu testen, ob sich die Selektivität von A-Domänen in Richtung auf ein anderes Substrat verändern lässt, sollte zunächst eine Methode entwickelt werden, um die Selektivität von GrsA-A (PheA) so zu verändern, dass die A-Domäne das von der Luciferase aktivierte D-Luciferin als Substrat akzeptiert.

Ausgehend von den von A. Neumüller klonierten Konstrukte pASKIBA3[*PheAA4A5*] und pASKIBA3[*LeuAA4A5*] (85), die Schnittstellen enthalten, um den für die aktive Tasche kodierenden Bereich (Core A4-A5) herauszuschneiden, wurde von M. Hammel je ein Konstrukt mit His₆-Tag konstruiert (146). Das Konstrukt pASKIBA3[*LeuAA4A5*] von A. Neumüller (85) wurde benutzt, um eine Methode zur Einführung von zufälligen Mutationen in den A4-A5 Bereich zu entwickeln. Außerdem wurde ausgehend von den Plasmiden pQE70[*LeuA/His-T*] bzw. pQE70[*PheA/His-T*] je ein Konstrukt hergestellt, dass die für eine *in vitro* Expression notwendigen Eigenschaften besitzt.

Basierend auf einem zuvor beschriebenen Assay (165) wurde eine Methode entwickelt, um die Anwesenheit der Luciferase in *E. coli in vitro* und *in vivo* nachzuweisen. Diese Methode kann anschließend verwendet werden, um auf A-Domänen Mutanten zu screenen, die Luciferin als Substrat akzeptieren.

5.4.1 Inhibitoren für GrsA-A und SrfA-C-A

In einer früheren Untersuchung konnte A. Neumüller zeigen, dass nicht hydrolisierbare Sulfamoyl-Adenylat Analoga zur Hemmung der Katalyse der NRPS A-Domänen eingesetzt werden können (85,176). Dazu wählte sie zwei A-Domänen, die Phe-aktivierende A-Domäne aus GrsA (im Weiteren PheA genannt), deren Kristallstruktur bekannt ist, sowie die Leu-aktivierende A-Domäne der SrfA-C Synthetase (im Folgenden LeuA genannt) (Abb. 49 A). Die A-Domänen wurden in einen pASKIBA Vektor kloniert, als StrepTagII Fusion produziert und mittels Streptactin Affinitätschromatographie gereinigt. Von Aventis R&T

(Frankfurt/Main) wurden die entsprechenden 5'-O-[N-(Aminoacyl)-sulfamoyl] Adenosin Derivate zur Verfügung gestellt (Abb. 49 B).

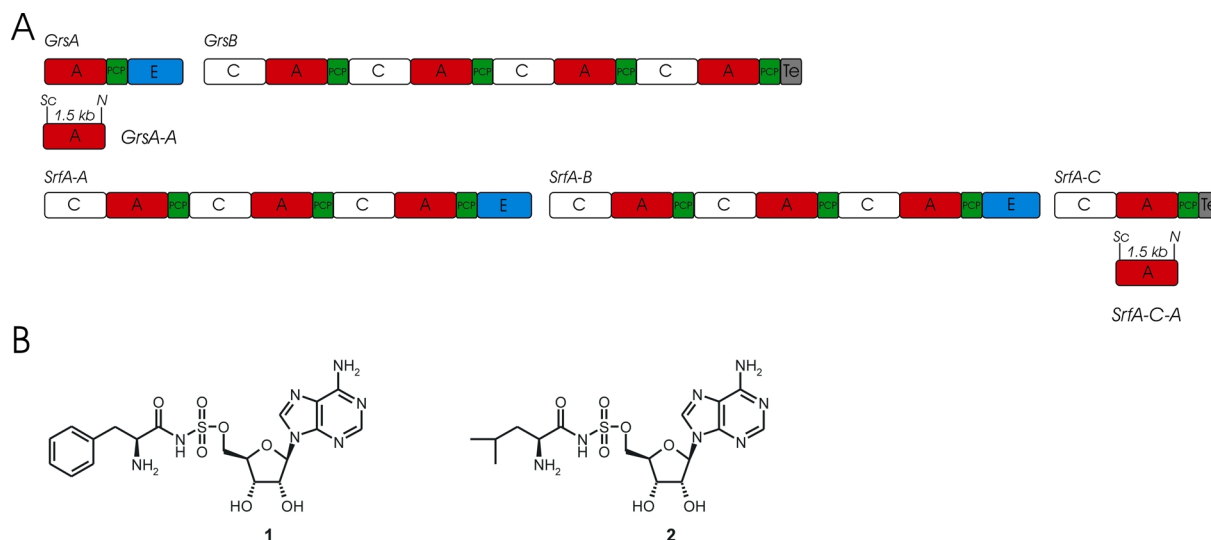


Abb. 49 Auswahl der A-Domänen und Inhibitoren. **A.** Über die Schnittstellen *SacII* und *NcoI* wurden die A-Domänen kodierenden Gensegmente *GrsA-A* und *SrfA-A-A* in einen pASKIBA kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die Streptag II Fusionsprotein GrsA-A (PheA) bzw. SrfA-C-A (LeuA) wurden anschließend mittels Streptactin Affinitätschromatographie gereinigt. **B.** Die Inhibitoren 5'-O[N-(Phenylalanyl)-sulfamoyl] Adenosin **1** und 5'-O[N-(Leucyl)-sulfamoyl] Adenosin **2** wurden von der Firma Aventis R&T dargestellt. Abk.: Grs: Gramicidin; Srf: Surfactin; A: A-Domäne; PCP: CP-Domäne; E: E-Domäne; C: C-Domäne, Sc: *SacII*; N: *NcoI*.

A. Neumüller untersuchte diese A-Domänen sowohl hinsichtlich des K_m -Wertes für die jeweilige AS, als auch des K_i für den jeweiligen Inhibitor. Die K_i lagen jeweils im niedrigen nanomolaren Bereich (61 bzw. 63 nM im Fall von PheA, 8.4 nM für LeuA), während die K_m bis zu 5000 mal höher lagen. Die Acyladenylatanaloga sind also als Inhibitoren für A-Domänen ebenso gut geeignet, wie für tRNA Synthetasen. Im nächsten Schritt sollte die Möglichkeit geprüft werden, ob ein mit einem Linker modifizierter Inhibitor, der sich an ein Matrix binden lässt, ebenfalls für die Inhibierung eingesetzt und in der gerichteten Proteinevolution von A-Domänen verwendet werden kann.

5.4.2 Linkermodifizierte Inhibitoren

Für die Kopplung der Inhibitoren an eine Matrix, musste zunächst untersucht werden, ob die A-Domänen eine Modifikation des 2'- und 3'-OH der Ribose tolerieren. Dazu wurden zunächst Inhibitoren mit einem Polyetherlinker modifiziert und in einem vergleichenden Assay mit den nicht modifizierten Inhibitoren eingesetzt. Des weiteren wurde ein Inhibitor getestet, dessen 3'-OH mit einem Polyether-Biotinlinker modifiziert ist. Da Biotin starke

Wechselwirkungen mit Streptavidin und Streptactin eingeht, wäre dieser Inhibitor geeignet, an eine Säulenmatrix zu binden.

5.3.1.1 Kreuzinhibierung und Inhibitoren mit Polyether- oder Polyetherbiotinlinker

Die von Aventis R&T bereitgestellten, linkermodifizierten Inhibitoren sind in Abb. 50 dargestellt. Für LeuA standen Inhibitoren **3** und **4**, für PheA die Inhibitoren **5** und **6** zur Verfügung.

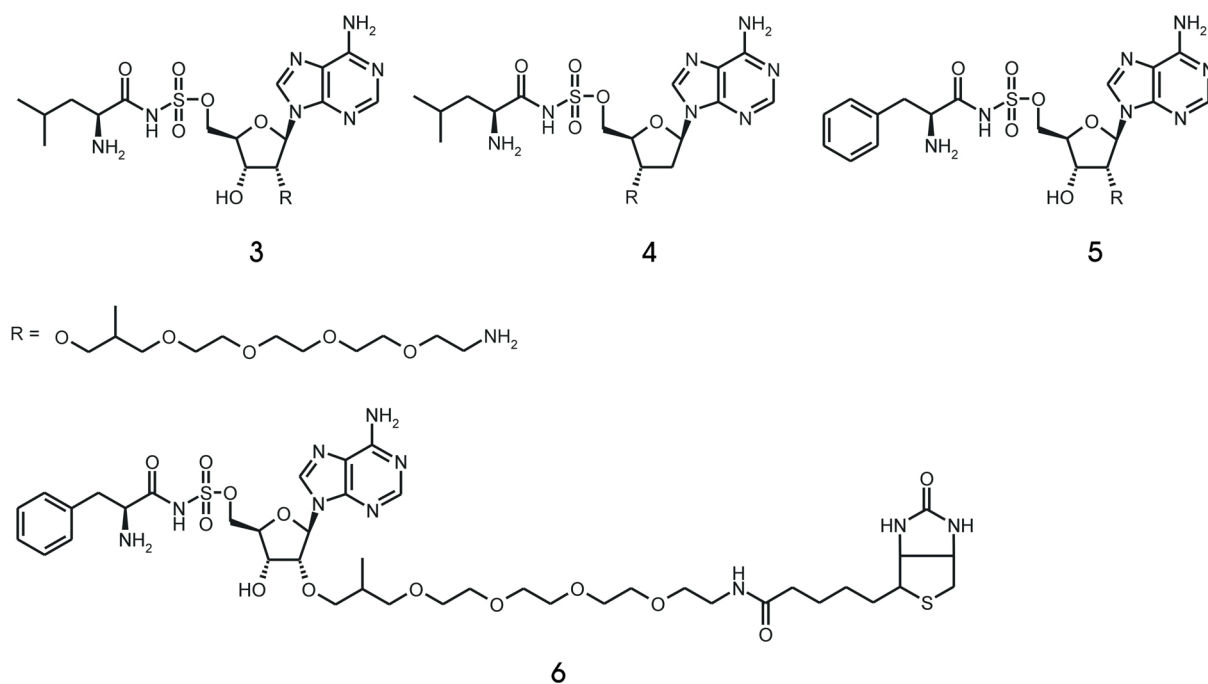


Abb. 50: Linkermodifizierte A-Domänen Inhibitoren. Von Aventis R&T wurden Inhibitoren **3** und **4** zur Inhibierung von LeuA und Inhibitoren **5** bzw. **6** für PheA zur Verfügung gestellt. Im Fall von **3** und **4** sind entweder das 2'- oder das 3'-OH mit einem Linker modifiziert, bei **5** und **6** wurde das 2'-OH modifiziert.

Zunächst wurden die Inhibitoren auf ihre Spezifität getestet. Dazu wurden die PheA Inhibitoren **1**, **5** und **6** im ATP/PPi-Austausch mit LeuA in den Konzentrationen 10 bis 300 nM eingesetzt. Wird der LeuA Inhibitor **2** in gleicher Konzentration eingesetzt so ist die Aktivität bei 100 nM bereits auf 92%, bei 300 nM auf 70% des Ausgangswerts ohne Inhibitor gesunken (Abb. 51). Gleichwohl ist die Aktivität nicht beeinflusst, wenn **1**, **5** oder **6** zugegen sind, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Inhibitoren spezifisch nur die A-Domäne inhibieren, für die sie synthetisiert wurden.

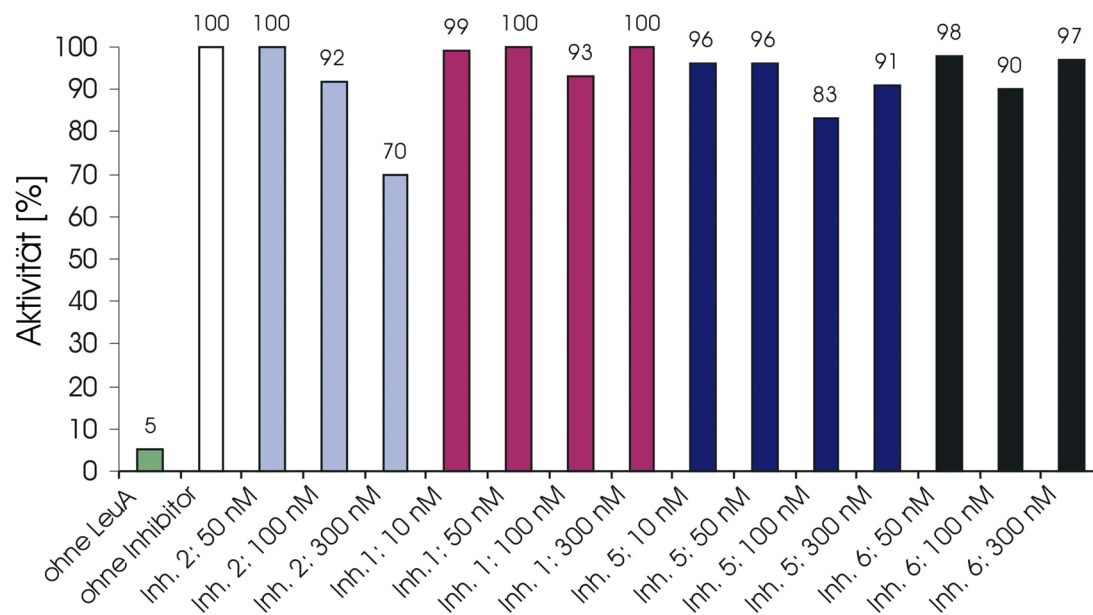


Abb. 51: Verwendung der PheA Inhibitoren im ATP/PP_i-Austausch mit LeuA. Der Leu-Inhibitor 2 führt in diesen Assays zur Reduktion der Aktivität von LeuA auf 92 bzw. 70% für Konzentrationen von 100 bzw. 300 nM. Sind statt dessen die PheA Inhibitoren 1, 5 oder 6 zugegen, bleibt LeuA unbeeinflusst.

Der Einfluss des Linkers auf die inhibitorischen Eigenschaften dieser Moleküle wurde durch ATP/PP_i-Austausch untersucht. Dabei wurden die Inhibitoren 3 und 4 mit LeuA im Vergleich mit dem nicht modifizierten Inhibitor 2 eingesetzt. Für PheA wurden die Inhibitoren 5 und 6 im Vergleich mit 1 in gleicher Weise verwendet (Abb. 52 und 53).

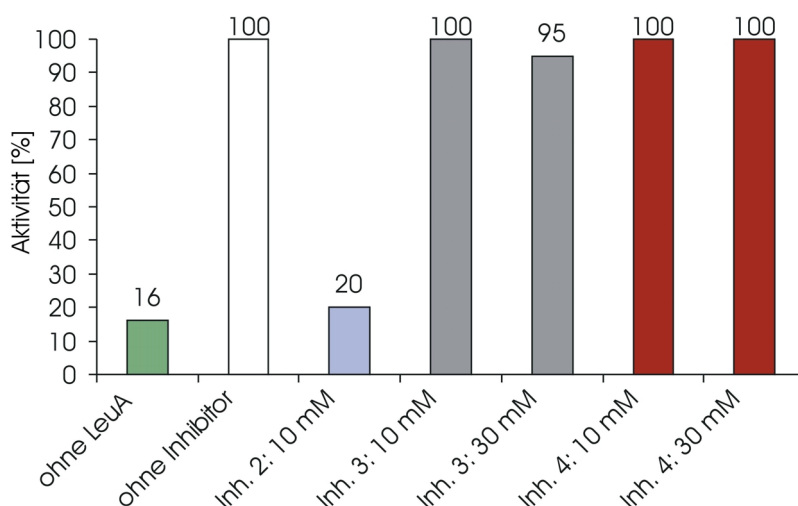


Abb. 52: Test der Linker modifizierten LeuA Inhibitoren mit LeuA. Verwendung des unmodifizierten LeuA Inhibitors in 10 mM Konzentration führt zu einem Aktivitätsverlust von 80 Prozentpunkten. Die mit einem Polyetherlinker modifizierten Inhibitoren 3 und 4 haben jedoch ihren inhibitorischen Effekt verloren, die Aktivität bleibt immer im Bereich der Reaktion ohne Inhibitor.

Die Verwendung der am 2'-OH oder 3'-OH modifizierten LeuA Inhibitoren 3 bzw. 4 mit LeuA führt zu keiner Reduktion der Aktivität der A-Domäne. Wird der ursprüngliche Inhibitor 2 in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt, so führt dies bereits zu einer

Reduktion der Aktivität auf 20% im Vergleich mit einer Reaktion ohne Inhibitor. Inhibitoren **3** und **4** inhibieren LeuA selbst bei einer Konzentration von 30 mM nicht (Abb. 52). Dies deutet darauf hin, dass die Modifikation der Inhibitoren im Fall von **3** und **4** zum Verlust des inhibitorischen Effekts führt und die Inhibitoren daher unbrauchbar werden. Das gleiche Experiment mit den PheA Inhibitoren **1**, **5** und **6** zeigt hingegen, dass diese Inhibitoren sich in ihrem aktivitätsvermindernden Effekt nicht unterscheiden (Abb. 53). Dies impliziert, dass der K_i unverändert ist.

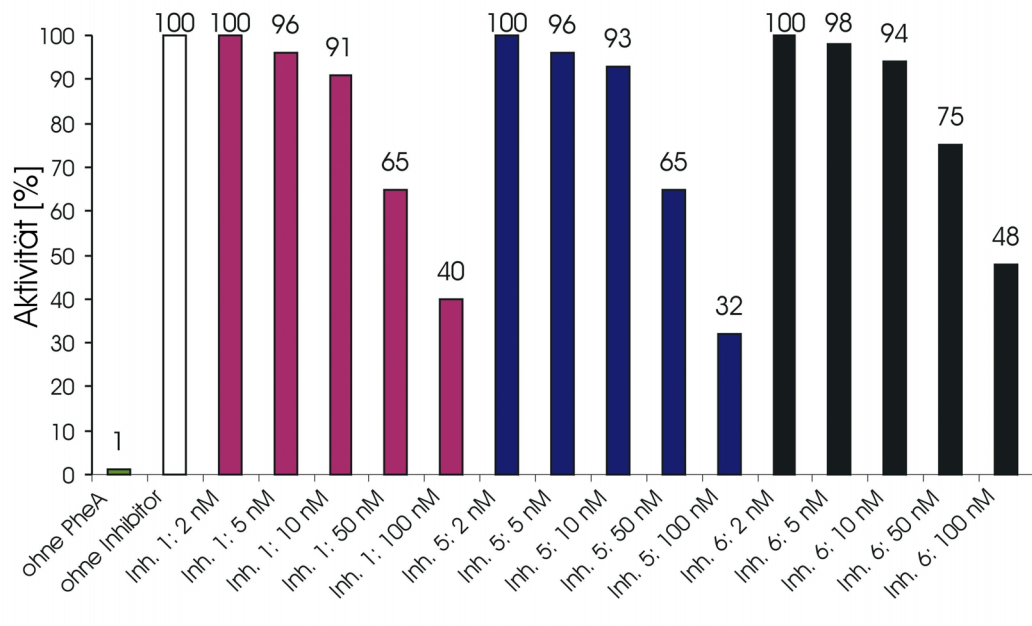


Abb. 53: Test der PheA Inhibitoren mit PheA. Sowohl der nicht-modifizierte Inhibitor **1**, sowie der Inhibitor, dessen 2'-OH mit einem Polyetherlinker (**5**) oder einem Polyetherbiotinlinker (**6**) modifiziert ist inhibieren die A-Domäne gleich gut, was auf einen unveränderten K_i hinweist.

Obwohl sich die LeuA Inhibitoren nicht für weitergehende Studien eignen, ist der niedrige K_i , den PheA mit seinen Inhibitoren hat, eine gute Voraussetzung für weitergehende Studien, wie z.B. gerichtete Proteinevolution. Dennoch zeigen diese Ergebnisse insgesamt eine gewisse Generalität im Inhibitor-Design für verschiedene A-Domänen. Es müssten möglich sein mit dieser Strategie Inhibitoren für jede beliebige A-Domäne zu synthetisieren.

5.4.1 Zufallsmutagenese des A4-A5 Bereichs

Um den Bereich, der für Core A4-A5 von PheA codiert, einer Zufallsmutagenese zur Herstellung einer A-Domänenbibliothek zu unterwerfen, wurde zunächst dieser Bereich der A-Domäne amplifiziert und als Templat in einer *error prone* PCR eingesetzt. Für diese *error prone* PCR wurden vier Ansätze vorbereitet, in denen jeweils ein dNTP in einer

Konzentration von 20 μM eingesetzt wurde, während die anderen dNTP in einer Konzentration von 200 μM vorlagen. Zu jedem Ansatz wurde 200 μM dITP gegeben, das während der PCR für die Einführung von Zufallsmutationen sorgt, da es sowohl mit A und C, als auch mit T basenpaart (s. 4.1.3). Die Ansätze wurden nach der PCR vereinigt, einem Restriktionsverdau unterzogen und mit dem geschnittenen Ausgangsvektor ligiert. *E. coli* wurde mit dieser Bibliothek transformiert. Aus 21 Einzelkolonien wurden Plasmide präpariert und der A4-A5 kodierende Bereich zur Überprüfung der Mutageneserate sequenziert. Diese Sequenzen befinden sich im Anhang (Abb. 70). Die Mutageneserate betrug 0.47% (insgesamt 35 Mutationen, 1.7 Mutationen/Klon).

5.4.2 In vitro Expression von A-Domänen

Zur *in vitro* Expression von *GrsA-A* und *SrfA-C-A* wurden Konstrukte eingesetzt, die einen T7-Promotor und eine RBS beinhalten, sowie ein PCR Produkt, das eine vom Hersteller des kombinierten Transkriptions/Translationssystems empfohlene Spacersequenz zwischen RBS und Start ATG beinhaltet (Abb. 54).

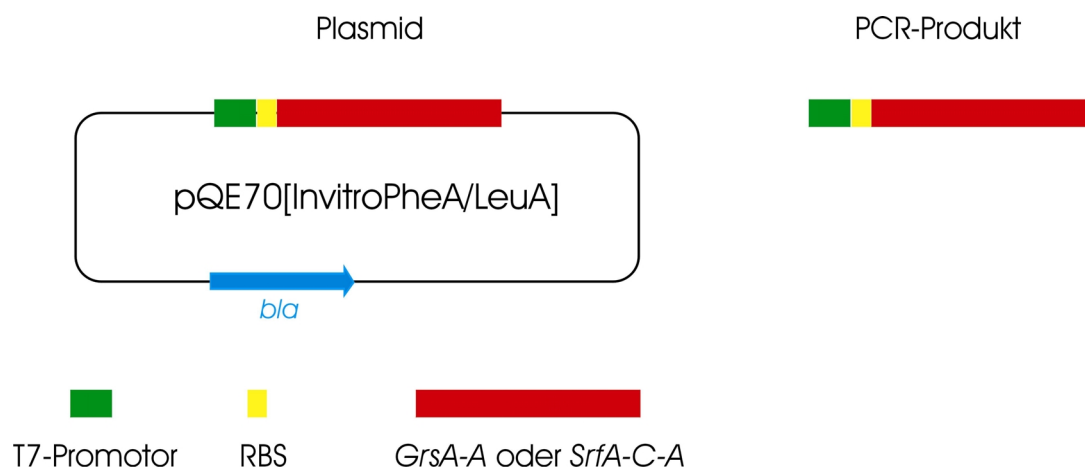


Abb. 54: In vitro Expression von *GrsA-A* und *SrfA-C-A*. Zur Expression wurde entweder ein Vektor mit T7-Promotor und RBS eingesetzt oder ein PCR Produkt von *GrsA-A*, das zusätzlich noch eine optimierte Spacersequenz zwischen RBS und Start ATG besaß.

In Abb. 55 ist das Ergebnis der *in vitro* Expression sowohl mit dem Vektor, als auch mit dem PCR Produkt als Templat gezeigt. Als Kontrolle wurde die zum Kit gehörende DNA des Gens der Chloramphenicolacetyltransferase (*CAT*) verwendet. In beiden Fällen konnte die Expression des *CAT* nachgewiesen werden (Abb. 55). Wurden die oben beschriebenen Vektoren verwendet, konnte weder für pQE70[invitroPheA] noch für das entsprechende LeuA-Konstrukt eine Expression nachgewiesen werden. Auch die Expression unter

Verwendung des PCR Produkts scheiterte. Auf Nachfrage gab der Hersteller des Kits an, dass His₆-Tag Fusionsproteine (wie auch in diesem Fall) bei der Produktion mit diesem Kit Probleme bereiten.

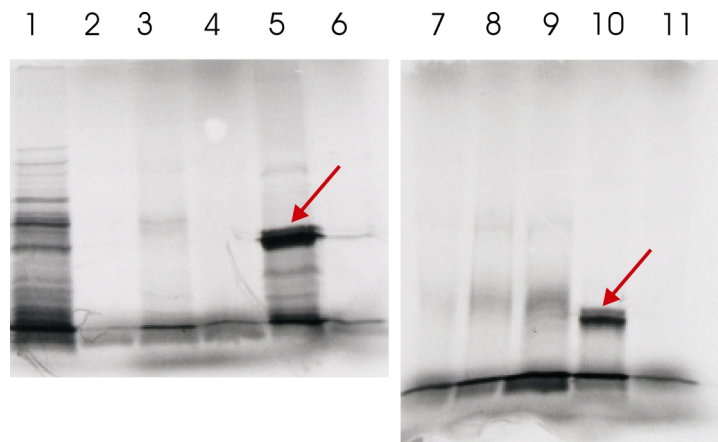


Abb. 55: SDS-Gel nach Radiographie der *in vitro* Produktion von PheA und LeuA. Für eine 60 min Expression mit dem PROTEINscript®-PRO wurden (1) 1 µg pQE70[invitroPheA] oder (2) 1 µg pQE70[LeuA], (3) 1 µg PCR PheA, (4) 1 µg PCR LeuA (5) 1 µg CAT (6) keine DNA, (7) 0.5 µg PCR PheA, (8) 1 µg PCR PheA, (9) 1.5 µg PCR PheA, (10) 1 µg CAT, (11) keine DNA eingesetzt. Der rote Pfeil markiert das Genprodukt von CAT.

Obwohl also zwei verschiedenen Präparationen des PheA-Vektors und verschiedene Mengen an PCR Produkt (zw. 0.5-1.5 µg) verwendet wurden, konnte keine Expression nachgewiesen werden. Daher muss eventuell der Affinitätstag am Protein geändert werden, um eine erfolgreiche Expression *in vitro* zu gewährleisten.

5.4.3 Luciferase: Verwendung *in vitro* und *in vivo*

Die *P. pyralis* Luciferase sollte in *E. coli* heterolog produziert werden. Dazu wurde die zugehörige cDNA, *luc*, in einen pQE-Vektor kloniert und die His₆-Fusion in *E. coli* überproduziert. Es folgte die Reinigung und ein Aktivitätstest *in vitro* mit D-Luciferin. Außerdem wurde *E. coli* M15-pQE60[*luc*] auf Nitrocellulosemembranen ausgestrichen und diese auf LB Festmediumplatten mit IPTG inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Durch anschließende Inkubation der Nitrocellulosemembranen in Luciferinlösung konnte die Luciferasereaktion *in vivo* beobachtet werden.

5.4.3.1 Produktion, Reinigung und *in vitro* Aktivität der Luciferase

E. coli M15 wurde mit pQE60[*luc*] transformiert und das His₆-Fusionsprotein der Luciferase anschließend in diesem Stamm produziert. Die Produktionskultur wurde bei 37 °C inkubiert und die Induktion der Expression erfolgte mit 1 mM IPTG. Das Protein hatte nach Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie eine ausreichende Reinheit von >95% (Abb. 56) und konnte in einer Ausbeute von 6 mg pro Liter Zellkultur erhalten werden. Allerdings lagen nur etwa 40% (nach Abschätzung durch SDS-PAGE) des Proteins in löslicher Form vor.

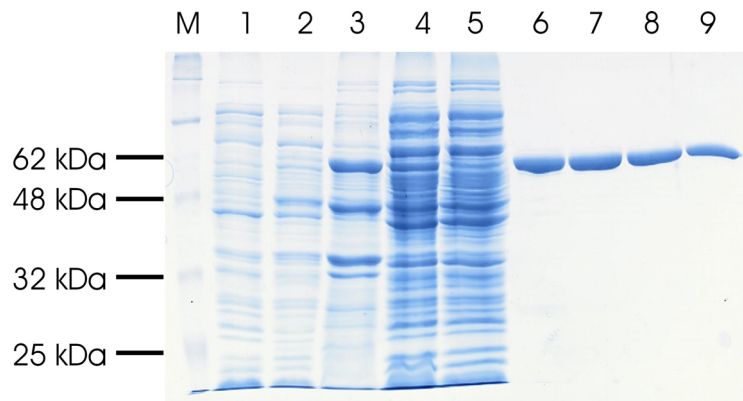


Abb. 56: Coomassie Brilliant blue gefärbtes SDS-Gel der Reinigung der Luciferase. Spur 1: Gesamtzellextrakt bei $t = 0$ h, 2: Gesamtzellextrakt bei $t = 3$ h, 3: Pellet des Zellaufschlusses, 4: Überstand des Zellaufschlusses, 5: Durchfluss der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie, 6-9: Vereinigte Fraktionen der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie, M: Proteinmarker.

Die Aktivität der Luciferase kann nach kurzer Inkubation mit D-Luciferin in einem Reaktionsgefäß mit dem bloßen Auge im Dunkeln beobachtet werden. Um die Aktivität dokumentieren zu können, wurden 125 μL Ansätze mit 300 nM Luciferase und 0.5 μM Luciferinlösung (1 mg/mL 100 mM Hepes (pH 8.0)) in einer 96-well Platte (200 μL /well) hergestellt und nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lumineszenz in einem Plattenlesegerät für 30 s ausgemessen. Kontrollreaktionen enthielten entweder kein Luciferin, keine Luciferase oder lediglich Puffer (Abb. 57).

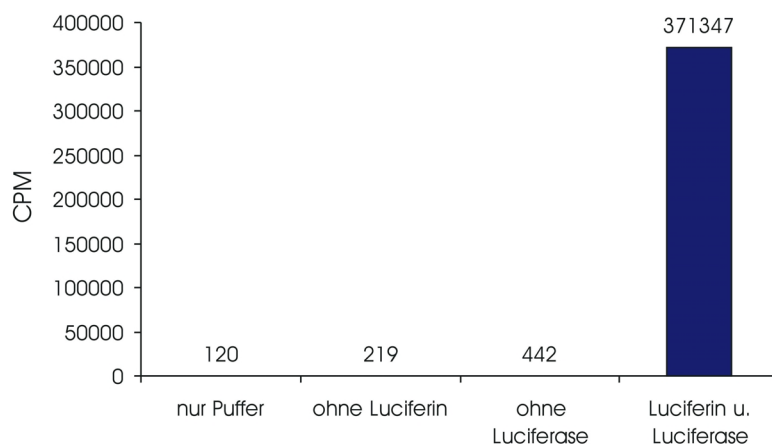


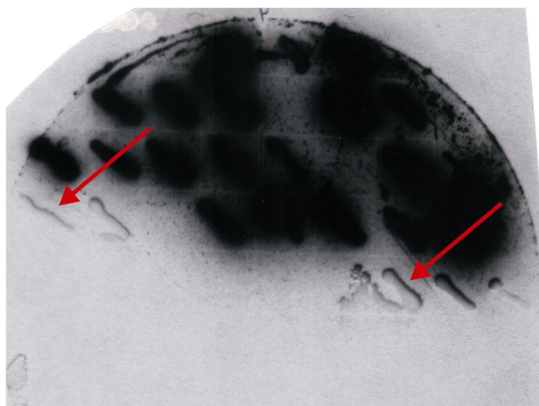
Abb. 57: Aktivitätstest der Luciferase. 300 nM Luciferase wurden mit 0.5 μM Luciferin 5 min bei RT inkubiert und dann die CPM in einem Plattenlesegerät ausgelesen. Kontrollreaktionen enthielten nur Puffer oder kein Luciferin bzw. Luciferase. Die Lumineszenz der Kontrollreaktionen beliefen sich auf weniger als 0.1% der Reaktionsansätze mit Luciferase.

Wie in Abb. 57 gezeigt, konnte erwartungsgemäß Lumineszenz nur gemessen werden, wenn sowohl Luciferin, als auch Luciferase zugegen waren. Die CPM der Kontrollreaktionen beliefen sich auf unter 0.1% der Reaktion mit diesen beiden Komponenten.

5.4.3.2 Beobachtung der Luciferaseaktivität *in vivo*

Der Literatur zufolge kann die Luciferaseaktivität auch *in vivo* in *E. coli* Zellen beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurden Nitrocellulosemembranen auf LB Festmediumplatten mit 100 µg/mL Ampicillin und 1 mM IPTG gelegt und *E. coli* M15-pQE60[*luc*] darauf ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C für ca. 24 h wurden Kolonien sichtbar. Die Nitrocellulosemembranen wurden von den Platten abgezogen und in eine frische Petrischale mit 800 µL einer Luciferinlösung in Citratpuffer (pH 4.5) gelegt. Diese Petrischale wurde anschließend 10 min lang im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach konnte die Luciferaseaktivität im Dunkeln mit dem bloßen Auge in Form leuchtender Kolonien beobachtet werden. Um ein permanentes Abbild dieses Phänomens zu erzeugen, wurden *E. coli* M15-pQE60[*luc*] und *E. coli* M15-pQE60 auf die Membran ausgestrichen. Die Membranen wurden wie oben beschrieben für 24 h inkubiert und ebenfalls in eine Petrischale mit 800 µL der Luciferinlösung gelegt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden die Nitrocellulosemembranen aus der Petrischale entnommen, mit den Kolonien zu unterst auf einen durchsichtigen Plastikfilm platziert und diese Kombination zwischen 2-30 min auf photographischem Film gelegt (Abb. 58).

A



B

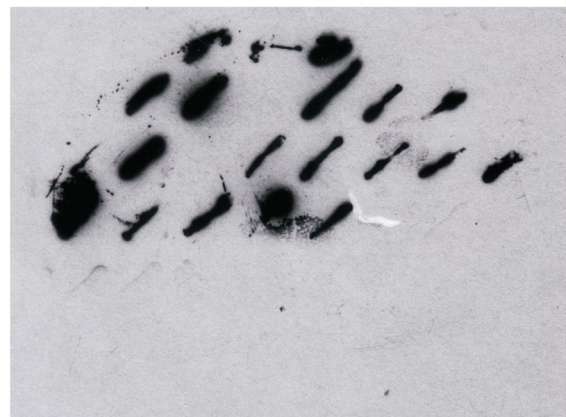


Abb. 58: Dokumentation lumineszierender *E. coli* auf photographischem Film. A. Nach 30 min Inkubation ist der Film stark geschwärzt und die Umrisse des *E. coli*-pQE60 Kontrollstamms (die roten Pfeile markieren zwei davon) und der Membran werden sichtbar. B. Nach zweiminütiger Inkubation auf Film sind die ausgestrichenen Kolonien *E. coli*-pQE60[*luc*] bereits sichtbar.

Durch die starke Lumineszenz der Reaktion war der Film jedoch nach 30 min schon so stark geschwärzt, dass auch die Umrisse des Kontrollstamms und der Membran sichtbar wurden (Abb. 58 A). Bereits nach 2 min ist der Film ausreichend geschwärzt, um die ein permanentes Abbild der Reaktion zu erhalten (Abb. 58 B).

Diese Methode ist somit sehr gut geeignet, um eventuelle Veränderungen der Selektivität einer A-Domäne in Richtung der Aktivierung von Luciferin zu beobachten. Nach

dem Auflegen auf Film kann die Membran abgezogen werden. Die darauf befindlichen Kolonien wachsen nach Umstreichen auf frische LB Platten wieder an und das in den Stämmen befindliche Plasmid kann anschließend präpariert werden.

6. Diskussion

6.1 Phosphopantetheintransfer

Die posttranslationale Modifikation der CP von ihrer inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form ist ein essentieller Prozess sowohl in Eukaryonten, als auch in Prokaryonten, ohne den die CP-abhängigen Stoffwechselwege ohne Funktion blieben. Diese Aufgabe übernehmen die 4'PP Transferasen. Sie transferieren das 4'PP von CoA auf die Hydroxygruppe des invarianten Serinrestes eines *apo*-CP, wodurch es in das *holo*-CP überführt wird. Das wichtigste Beispiel eines solchen Stoffwechselwegs in Prokaryonten ist die Fettsäuresynthese, die für die Zelle essentielle Bedeutung hat. Unter Eisenmangelbedingungen sind auch die Siderophore für die Zelle unentbehrlich. Die Siderophore sind Moleküle, die Eisenionen der Umgebung mit hoher Affinität binden und dann in die Zelle zurück transportieren, um sie dort wieder freizusetzen. Die Synthese der katecholischen Siderophore erfolgt durch die Nichtribosomalen Peptidsynthetasen, deren integrierte (Typ I) CP die Träger der Intermediate sind. Die Intermediate werden nicht direkt am CP gebunden, sondern als Thioester am 20 Å langem 4'PP Arm. Dieser Arm ist flexibel und dient der Präsentation der Intermediate für die verschiedenen Enzyme, von denen sie prozessiert werden. Ist der letzte Schritt der Synthese erreicht, kann das als energiereicher Thioester gebundene Produkt mit geringem Energieaufwand abgespalten werden.

Das CP muss also nicht nur verschieden Syntheseintermediate tragen, sondern auch mit einer Vielzahl verschiedener Enzyme interagieren. Daher werden besondere Anforderungen an seine Flexibilität und Substrattoleranz gestellt. Trotz ihrer ähnlichen Struktur haben die CP jedoch unterschiedliche Aufgaben. So tragen ACP Acylreste, während PCP auf Aminoacyl- bzw. Peptidylreste spezialisiert sind und ArCP Arylreste binden. Aufgrund der Einbindung der CP in den Primär- oder Sekundärstoffwechsel ist es nicht überraschend, dass ihre Modifikation in vielen Bakterien auch von verschiedenen PPTasen übernommen wird. Neben der Spezialisierung der PPTasen sind ihrer Größe und pI Kriterien, die zu einer Einteilung in verschiedene Gruppen geführt hat. Die trimeren AcpS-Typ PPTasen sind für die Modifikation des FAS ACP zuständig, während die CP des Sekundärmetabolismus nicht als Substrat akzeptiert werden. Ihre Modifikation erfolgt durch die monomeren Sfp-Typ PPTasen, deren Substrattoleranz höher sein kann.

6.1.1 Charakterisierung von *B. subtilis* AcpS und Sfp

6.1.1.1 CP-abhängige Stoffwechselwege in *B. subtilis*

B. subtilis unterhält einige CP-abhängige Stoffwechselwege, die posttranslational modifiziert werden müssen. Darunter ist zum einen die Fettsäuresynthase, die Teil des Primärstoffwechsels ist, mit ihrem ACP, das als Träger der Intermediate der Fettsäuresynthese dient. Ein anderer solcher Stoffwechselweg, welcher der Modifikation der Zellwand mit D-Ala dient, ist der D-Ala-4'PP-DCP abhängige Transfer von D-Ala auf freie Hydroxygruppen der Teichonsäuren. Dazu wird *holo*-DCP, katalysiert durch die D-Alanyl Carrier Protein Ligase DltA, mit D-Ala beladen. Dieser Prozess, der die Ladung der Zellwand moduliert, ist für das Überleben der Zelle zwar nicht essentiell (123), sollte aber als Komponente der Zellwandbiosynthese eher dem Primär-, als dem Sekundärmetabolismus zugeordnet werden. Neben ACP und DCP enthält das Genom von *B. subtilis* noch drei große Gen-Cluster, *srfA*, *pps* und *pksX* zur Produktion von Sekundärmetaboliten sowie das *dhb* Operon zur Synthese des Siderophors Bacillibactin (25). Diese Gene machen ca. 4% des gesamten Chromosoms aus. Die multifunktionalen NRPS und PKS beinhalten im Ganzen 40 Typ I CP. Außerdem konnte stromaufwärts des *pksX* noch ein zusätzliches Typ II (einzelständiges) ACP (AcpK) gefunden werden, so dass sich die Gesamtanzahl der CP in *B. subtilis* auf 43 erhöht (94).

6.1.1.2 Modifikation der CP durch AcpS und Sfp

Im Gegensatz zu der hohen Anzahl an CP gibt es in *B. subtilis* nur zwei PPTasen für deren Umwandlung von der *apo*- in die *holo*-Form. Sfp, die PPTase, die in der Literatur zunächst der Surfactin NRPS zugeordnet wurde, ist in der Vergangenheit biochemisch charakterisiert worden. Es zeigte breite Substrattoleranz hinsichtlich seiner Proteinpartner und hat seither Anwendung in der Modifikation rekombinanter NRPS und PKS sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gefunden. Bisher ist für Sfp kein CP bekannt, das nicht als Substrat akzeptiert wird. Zu den bisher getesteten Proteinsubstraten zählt z.B. *E. coli* ACP sowie die CP der Surfactin NRPS (23,65), der Bacillibactin NRPS (25) und die Fengicin und Plipastatin NRPS von *B. subtilis*. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Sfp für die Modifikation aller CP in *B. subtilis* verantwortlich ist.

Zu Beginn dieser Arbeit war die zweite PPTase in *B. subtilis*, AcpS, bereits mit B.s.-ACP und CoA charakterisiert worden (92). Wie zuvor schon bei der Charakterisierung von *S. pneumoniae* AcpS mit dem kognaten ACP (80), konnten für B.s.-ACP zwei K_m - und k_{cat} -Werte für niedrige und hohe Substratkonzentrationen bestimmt werden. Dieses Verhalten

könnte auf eine positive kooperative Bindung von *apo*-ACP hindeuten. Interessanter Weise konnte auch für Sfp mit B.s.-ACP ein erster und zweiter Sättigungsbereich erreicht werden, wohingegen mit AcpK normales Michaelis-Menten Verhalten beobachtet wurde, wie es zuvor mit anderen (heterologen) ACP und PCP beschrieben wurde (23).

Für *E. coli* AcpS (33% Identität mit *B. subtilis* AcpS) wurde zuvor gezeigt, dass es nicht nur sein kognates ACP, sondern auch verschiedene ACP von Typ II PKS (74) und DCP von *Lactobacillus casei* (75) modifizieren kann. Auch *B. subtilis* AcpS ist in der Lage das DCP (17.9% Identität mit ACP) als Substrat zu modifizieren, TycC3-PCP wird jedoch, wie erwartet, nicht als Substrat akzeptiert. Überraschender Weise konnte für DCP als Substrat kein zweiter K_m -Wert für Konzentrationen oberhalb 10 μM bestimmt werden, da Substrathemmung eintritt. Verglichen mit dem K_m -Wert für niedrige B.s.-ACP Konzentrationen ist der K_m -Wert für DCP um den Faktor 44 erhöht und die katalytische Effizienz 6 mal niedriger so dass AcpS offensichtlich eine deutliche Präferenz für ACP hat. Der k_{cat} dieser Reaktion ist jedoch mit 169 min^{-1} im Bereich des k_{cat} für hohe B.s.-ACP Konzentrationen, sodass man davon ausgehen kann, dass DCP trotzdem ausreichend modifiziert wird.

Das von Mootz identifizierte, zweite ACP in *B. subtilis*, AcpK (94), wird überraschender Weise nicht von AcpS modifiziert. Die Tatsache, dass Sfp AcpK *in vitro* modifiziert ist eine erneute Bestätigung der hohen Substrattoleranz dieses Enzyms hinsichtlich des Proteinsubstrats. Daher wäre die einfache Interpretation dieser Daten, dass AcpS für die Modifikation der beiden CP des Primärmetabolismus, B.s.-ACP und DCP, zuständig ist und Sfp das 4'PP für die CP des Sekundärmetabolismus bereitstellt. Dies würde der Situation in *E. coli* entsprechen, in der AcpS für die Modifikation des FAS ACP zuständig ist und EntD lediglich EntB/EntF des Sekundärmetabolismus erkennt, aber keine Überschneidung der Zuständigkeit existiert (Abb. 59).

Die hier vorgestellten Daten zeigen jedoch, dass Sfp *in vitro* die CP ACP und DCP des Primärmetabolismus modifizieren kann und offensichtlich nicht scharf zwischen CP des Primär- und Sekundärmetabolismus unterscheidet. Dies legt nahe, dass der 4'PP Transfer im Gram positiven *B. subtilis* anders geregelt ist, als in *E. coli*. Die K_m -Werte von Sfp und AcpS für *apo*-B.s.-ACP sind vergleichbar (ca. acht mal niedriger für niedrige Konzentrationen und zwei mal niedriger für hohe Konzentrationen), wohingegen die k_{cat} Werte von Sfp etwa um den Faktor 10 niedriger liegen. Dies entspricht einer Verringerung der katalytischen Effizienz um den Faktor 110 für niedrige *apo*-B.s.-ACP Konzentrationen und um den Faktor 6 für hohe Konzentrationen. Das Verhältnis ist im Fall von DCP etwas anders. Obwohl der K_m von Sfp

für DCP mit 50.4 μM fast sechs mal niedriger ist, als der von AcpS und die katalytische Effizienz von Sfp um den Faktor 3.4 erniedrigt ist, ist dies das erste CP, das von beiden Enzymen mit ähnlich hoher Geschwindigkeit (169 min^{-1} bzw. 287 min^{-1}) modifiziert wird.

Insgesamt zeichnet sich also ein Szenario ab, in dem AcpS für die Modifikation der CP des Primärmetabolismus zuständig ist, da es diese mit höherer katalytischer Effizienz modifiziert, als Sfp (Abb. 59).

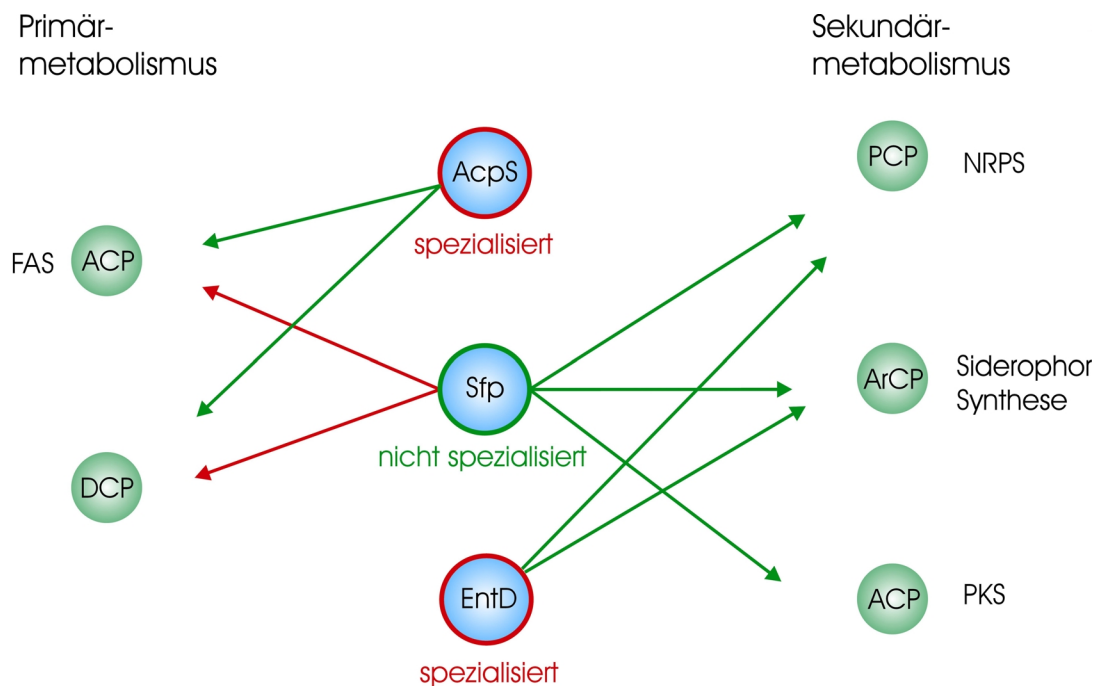


Abb. 59: 4'-Phosphopantethein Transfer in *B. subtilis* und *E. coli*. Dargestellt sind die verschiedenen CP Typen, d.h. FAS ACP und DCP des Primärmetabolismus und PCP, ArCP und PKS ACP des Sekundärmetabolismus. Grüne Pfeile symbolisieren hohe katalytische Effizienz, rote Pfeile niedrige. In *E. coli* modifiziert AcpS lediglich das FAS ACP (DCP ist im Gram negativen *E. coli* nicht vorhanden), wohingegen EntD nur die CP der Enterobactinsynthese modifiziert. In *B. subtilis* modifiziert AcpS die CP des Primärmetabolismus mit hoher katalytischer Effizienz. Sfp modifiziert die CP des Sekundärmetabolismus mit hoher Effizienz und kann aber das FAS ACP und DCP ebenfalls modifizieren.

Sfp hingegen ist zwar hauptsächlich für die Modifikation der PCP und ArCP des Sekundärmetabolismus zuständig, scheint aber auch katalytisch gesehen kompetent genug, um AcpS in *B. subtilis* zu ersetzen. H. Mootz konnte durch Unterbrechung des *acpS* Gens in *B. subtilis* zeigen, dass die *in vitro* Daten auch unter den stringenteren *in vivo* Bedingungen bestätigt werden (94). Wachstumskurven konnten zeigen, dass der Phänotyp der Disruptionsmutante vom Wildtyp nicht zu unterscheiden ist und eine dem Wildtyp vergleichbare Menge Surfactin produzierte.

Die Tatsache, dass nicht nur Sfp, sondern auch andere PPTasen dieses Typs wie etwa Gsp aus *B. brevis* in der Lage sind *E. coli* AcpS *in vivo* zu komplementieren (94), ist eine weitere Demonstration der breiten Substrattoleranz dieser Enzyme. Dies lässt vermuten, dass

eine hohe Substrattoleranz bei Sfp-Typ PPTasen häufig vorkommt oder sogar eine generelle Eigenschaft ist.

Die Rolle von AcpK ist bisher ungeklärt. Aufgrund seiner Lokalisierung innerhalb des *pksX* Operons kann vermutet werden, dass es eine Funktion in der Polyketidsynthese hat. Nach den vorliegenden Daten ist es jedoch auch denkbar, dass AcpK der Donor der Fettsäure für die Biosynthese des Surfactin und Fengycin ist. Ein anderer Kandidat für diese Aufgabe ist das FAS ACP selbst, da die Fettsäureeinheit dieser Antibiotika ein Intermediat der Fettsäuresynthese ist.

6.1.2 Charakterisierung von PcpS

6.1.2.1 *P. aeruginosa* besitzt nur eine PPTase des Sfp-Typs

Die Tatsache, dass PPTasen des Sfp-Typs, besonders Sfp selbst, die enzymatische Aktivität von AcpS *in vivo* komplementieren können stellt die Notwendigkeit einer AcpS-Typ PPTase in Stämmen, die auch eine Sfp-Typ PPTase besitzen, in Frage. Strukturelle und Sequenzdaten haben darauf hingewiesen, dass die Sfp-Typ PPTasen möglicherweise aus den AcpS-Typ PPTasen durch Genfusion gefolgt von Diversifikation der beiden Hälften hervorgegangen sind. Diese Evolution fand vermutlich statt, als die CP mit anderen Enzymen fusionierten, um die heute bekannten multifunktionalen FAS, NRPS und PKS zu bilden. Die neue Architektur dieser großen Proteintemplate war vermutlich für die katalytische Tasche von AcpS nicht zugänglich. Aus diesem Grund beinhalten viele Organismen zwei PPTasen, wenn Sekundärmetabolite über einen NRPS oder PKS Syntheseweg produziert werden. Einige der inzwischen sequenzierten Bakterienstämme scheinen ihre PPTase des Sekundärmetabolismus verloren zu haben. H. Mootz konnte durch die Unterbrechung von AcpS in einem *sfp*⁺-*B. subtilis* Stamm zeigen, dass die PPTase des Sekundärmetabolismus, Sfp, in der Lage ist, die Funktion von AcpS in diesem Stamm zu übernehmen. Zum einen war das Wachstum des Deletionsstammes vom Wildtyp nicht zu unterscheiden, zum anderen produzierte dieser Stamm dem Wildtyp vergleichbare Mengen Surfactin (94). Sfp scheint also katalytisch gesehen kompetent genug, um das 4'PP für alle vorhandenen CP bereit zu stellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es plausibel, dass Organismen, die zusätzlich zu einer Sfp-Typ PPTase auch eine vom AcpS-Typ besitzen diesen entbehrlichen Ballast allmählich abstoßen. Die BLAST Untersuchungen im *P. aeruginosa* Genom mit der Sequenz von *B. subtilis* AcpS, *E. coli* AcpS, Sfp und EntD zeigten, dass dieser Organismus offensichtlich nur eine PPTase, PcpS, besitzt. ORF *PA1165* kodiert für PcpS, einem Protein

von 27 kDa (242 AS) mit einem isoelektrischen Punkt von 6.77, das die typischen konservierten Bereiche von PPTasen zeigt (Abb. 60). Diese Daten weisen auf eine Zugehörigkeit von PcpS zu den Sfp-Typ PPTasen hin. Obwohl PcpS nur geringe Ähnlichkeit mit der Prototyp PPTase dieser Gruppe, Sfp, aufweist (13.9%), ist die Ähnlichkeit zu EntD nicht nur im Bereich zweier Core-Motive (Abb. 60), sondern auch insgesamt mit 51% relativ hoch. Es lag also die Vermutung nahe, dass PcpS eine Besonderheit innerhalb der Sfp-Typ PPTasen darstellt.

MVDMKTTHTS-----L	PFAGHTLHFVE	FD	PANFCEQD--LLWLPHYAQLQH	AGRKRKTEH	LAG-RIA	AVYALREY-	EntD
MRAMNDRLPSFCTPLDDR	WPLPVALPGVQLRSTR	FD	PALLQPGDFALAGIQPPANILRA	VAKRQAEFL	LAG-RLC	ARAALFALD	PcpS
MKIYGIYMDR-----P	LS--QEENER	FMTFISPEKR--EK-CRRFYHKED	AHRTLLGDVLR	SVISRQYQL	DKSD		Sfp
GYKCVPAIGELRQPVWP	AEVY	GSISHCGTTALAVVSRQ----	PIGIDIE	EIFSVQTARELTDNIITPAE	HERLAD-CGL	AFSL	EntD
GRAQTPAVGEDRAPVWP	AAIS	GSITHGDRWAAALVAARGDWRGL	GLDVE	TLLEAERARYLHGEILTEGERLRF	ADDLERRTGL		PcpS
IRFSTQEY	GKPCIPDL	PDAHFN-ISH	GRWVIGAFDSQ----	PIGIDIE	KTKPIS--LEIAKRFFSKTE	YSDLLAKDKDEQTD	Sfp
ALT	LAFSAKESAFK	ASEIQT-----DAGFLDYQII	SWNKQQVIIH-----RENEMFAVHWQI	KEKIV-----ITLCQHD			EntD
LVT	LAFSLKESLFK	ALYPLVGKRFYFEHAELLEWRADGQARLL	LDLSPEWRHGSELDAQFAVL	DGRL-----LSLVAVGA			PcpS
YFYHLWS	MKESFIK	QEGKGLSLP---LDSFSVRLHQD	GQVSIELPDSHSPCYIKTYEVD	PGYKMAVCAAHPDFPEDITMVS	YEELL		Sfp

Abb. 60: Sequenzalignment von EntD, PcpS und Sfp. AS, die in allen drei PPTasen konserviert sind, wurden rot hervorgehoben. Die Core-Motive der PPTasen sind gelb unterlegt. Im vom N-Terminus gesehen ersten Core-Motiv gleichen sich EntD und PcpS sehr, während EntD das gleiche zweite Core-Motiv aufweist, wie Sfp. Im dritten Core-Motiv weisen PcpS und EntD wieder die größte Ähnlichkeit auf.

6.1.2.2 PcpS zeigt PPTase-Aktivität *in vivo* und *in vitro*

Im Radioaktivassay konnte gezeigt werden, dass AcpS und Sfp sowohl B.s.-ACP, als auch P.a.-ACP *in vitro* modifizieren können. Sfp konnte im gleichen Assay erfolgreich zu Modifikation des pchE-ArCP eingesetzt werden, AcpS konnte wie erwartet diese CP des Sekundärmetabolismus von *P. aeruginosa* jedoch nicht modifizieren. Die Tatsache, dass PcpS sowohl beide ACP Substrate, als auch pchE-ArCP von der *apo*- zur *holo*-Form modifizieren konnte, macht die PPTase-Aktivität dieses Enzyms deutlich. Außerdem wurde von Solsbacher (Aventis R&T) ein genetisches System verwendet, das die PPTase-Aktivität von PcpS *in vivo* zeigen konnte (173). Dieses ist in Anlehnung an ein von H. Mootz verwendetes System (55) entwickelt worden und testet die PPTase-Aktivität durch Komplementation von *S. cerevisiae* Lys-5. *LYS5* kodiert die PPTase Lys-5, die für die Modifikation der α -Aminoadipat Reduktase (Lys-2) essentiell ist. Sowohl *E. coli* EntD, PcpS, als auch Lys-5 wurden dazu in einem

Δ LYS5 Stamm von *S. cerevisiae* exprimiert. Die Fähigkeit dieser PPTasen Lys-5 *in vivo* zu komplementieren wurde durch Ausstreichen dieser Stämme auf Festmediumplatten ohne Lysin verifiziert. Sowohl PcpS, als auch EntD konnten Lys-2 zur aktiven *holo*-Form modifizieren, was den Stämmen die Fähigkeit verleiht, Lysin zu produzieren. Außerdem wurde dadurch die PPTase-Aktivität von PcpS und EntD *in vivo* bestätigt.

6.1.2.3 Proteinpartner von PcpS

Obwohl für die am Besten charakterisierte PPTase, Sfp, bis heute kein CP bekannt ist, das nicht als Substrat akzeptiert wird, differenziert die PPTase *in vitro* zwischen CP des Primär- und Sekundärmetabolismus (Abb. 59). Die katalytische Effizienz mit TycC3-PCP ist $21.6 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$. Es sollte jedoch bedacht werden, dass das hier getestete TycC3-PCP nicht das natürliche Substrat von Sfp ist. Allerdings ist Sfp mit den PCP der Module 1 und 2 der Surfactin Synthetase B charakterisiert worden (23). Die katalytische Effizienz mit diesen PCP war mit 80 bzw. $31 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ sogar noch höher. Im Fall von CP des Primärmetabolismus sind die katalytischen Effizienzen jedoch weitaus niedriger. So ist die katalytische Effizienz von Sfp mit B.s.-ACP $0.3 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ sehr niedrig, was auch auf andere ACP zutrifft, die als Substrat für Sfp getestet wurden. Diese Daten zeigen, dass Sfp ein Enzym des Sekundärmetabolismus ist, das CP des Primärmetabolismus nur mit erheblich erniedrigter Effizienz modifiziert. Ganz im Gegenteil dazu modifiziert AcpS CP des Primärmetabolismus mit hoher Effizienz. So ist die katalytische Effizienz mit B.s.-ACP 110 bzw. $1.8 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ (für niedrige bzw. hohe Substratkonzentrationen), ArCP und PCP werden jedoch nicht als Substrat akzeptiert. Daher scheinen Organismen, die PPTasen beiden Typs besitzen eine davon für den Primär- und eine für den Sekundärmetabolismus ausgewählt zu haben. *E. coli* ist in dieser Hinsicht ein Extrembeispiel, da nicht nur die katalytischen Effizienzen auf eine Trennung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus hinweisen, sondern auch keinen Überschneidung der Substratelektivitäten von AcpS und EntD stattfindet, also eine stricte Trennung vorliegt.

Die hohe Ähnlichkeit zwischen PcpS und EntD legt die Vermutung nahe, dass auch die Substratelektivitäten ähnlich sein könnten. Allerdings wäre *P. aeruginosa* dann nicht in der Lage ohne eine AcpS-Typ PPTase auszukommen. Zunächst konnte durch den Radioaktivassay festgestellt werden, dass PcpS im Gegensatz zu AcpS sowohl ACP, als auch pchE-ArCP erkennt und modifiziert. Im Hefe *two-hybrid system* konnte außerdem gezeigt werden, dass pvdD1-PcP *in vivo* von PcpS als Substrat akzeptiert wird. Diese Daten stehen im Einklang mit der breiten Substrattoleranz, die von dieser PPTase erwartet würde.

6.1.2.4 PcpS ist eine PPTase des Primärmetabolismus

Nachdem die Proteinpartner von PcpS identifiziert werden konnten, wurde mit der biochemischen Charakterisierung von PcpS begonnen. Zunächst wurde der optimale pH-Wert für die PPTase-Aktivität von PcpS bestimmt. Das pH-Optimum (6.5) ist nahezu identisch mit dem von Sfp (6.0). Die Interpretation der bis dahin erhaltenen Daten war, dass die Situation in *P. aeruginosa* mit der des *B. subtilis* AcpS-Deletionsstammes vergleichbar ist.

Bei der weitergehenden biochemischen Charakterisierung konnte zunächst jedoch kein K_m -Wert für CoA bestimmt werden, da PcpS durch hohe CoA-Konzentrationen gehemmt wird. Dieses Phänomen ist bisher noch bei keiner PPTase aufgetreten. Des weiteren ist PcpS offensichtlich für die Aktivierung der CP des Primärmetabolismus optimiert worden. So konnte für das kognate P.a.-ACP eine katalytische Effizienz von 32.5 bzw. $2.6 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ (für niedrige bzw. hohe Substratkonzentrationen) bestimmt werden, während die Effizienzen mit pchE-ArCP 1.1 und $0.13 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ waren. Dies entspricht einer 30- bzw. 20-fachen Verringerung der katalytischen Effizienz verglichen mit P.a.-ACP.

Das Enzym erkennt und modifiziert auch nicht kognate CP mit ähnlicher Effizienz. Nach verschiedenen vergeblichen Versuchen PCP der Pyoverdin und Pyochelin NRPS heterolog in *E. coli* zu produzieren, wurde das bereits häufig verwendete TycC3-PCP zur Charakterisierung von PcpS herangezogen. Nichts desto trotz konnte die erfolgreiche Interaktion von pvdD1-PCP, dem PCP des ersten Moduls der Pyoverdin Synthetase D, sowie von pchE-ArCP in einem Hefe *two-hybrid system* nachgewiesen werden (s. 6.1.2.3). *In vitro* ist die Situation mit TycC3-PCP die gleiche wie mit pchE-ArCP, da die katalytische Effizienz mit 0.04 und $1.1 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ niedrig ist. B.s.-ACP wird jedoch mit 8.6 bzw. $2.9 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ modifiziert. Besonders der letztere Wert für hohe (25-206 μM) Konzentrationen ist innerhalb der Fehlertoleranz des Wertes für das natürliche ACP. Die Situation im Fall von PcpS ist also fast das genaue Gegenteil wie im Fall von Sfp (Abb. 61).

Eine anderer, sehr auffälliger Unterschied zwischen PcpS und Sfp ist die Tatsache, dass für alle getesteten CP zwei K_m - und k_{cat} -Werte bestimmt werden konnten. Dieses Phänomen wurde zum ersten Mal bei AcpS von *S. pneumoniae* (80), und wie oben beschrieben, auch bei AcpS von *B. subtilis* (6.1.1.2) festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte für keine PPTase bisher Sättigung bei hohen und niedrigen ArCP und PCP Konzentrationen gemessen werden. Um das Phänomen der zwei K_m -Werte bei AcpS-Typ PPTasen zu erklären, wurde ein Modell vorgeschlagen, nachdem das homotrimere AcpS mit seinen drei aktiven Taschen allosterisch reguliert wird (80,94). Diese Art der Regulation ist für die monomeren Enzyme Sfp und PcpS jedoch nicht vorstellbar, da sie nur eine einzelne aktive Tasche

besitzen (81). Eine andere Erklärung wäre, dass CP strukturelle Veränderungen erfahren, die sowohl pH-abhängig (102), als auch konzentrationsabhängig (168) induziert werden. Dies mag eine Erklärung für die Werte von Sfp liefern, deutet aber auf einen Unterschied in der CP Erkennung durch PcpS hin, verglichen mit Sfp.

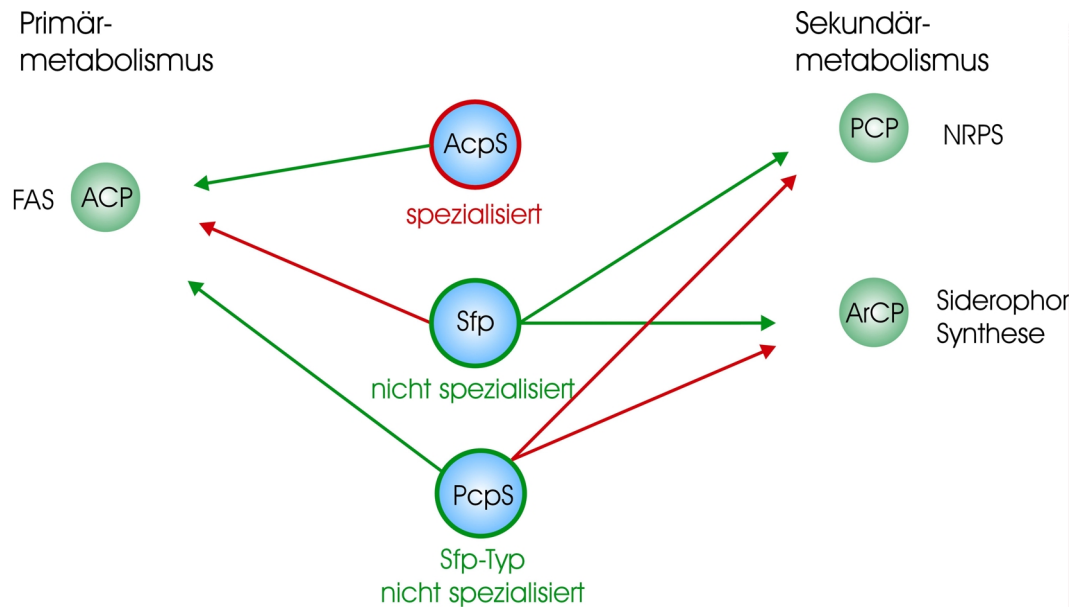


Abb. 61 **Katalytische Effizienz von *B. subtilis* AcpS, Sfp und *P. aeruginosa* im Vergleich.** Dargestellt sind das FAS ACP des Primärmetabolismus sowie die CP PCP und ArCP des Sekundärmetabolismus. Grüne Pfeile symbolisieren hohe katalytische Effizienz, rote Pfeile niedrige. In *B. subtilis* modifiziert AcpS lediglich das FAS ACP, wohingegen Sfp alle CP modifiziert, allerdings mit deutlicher Präferenz für die CP des Sekundärmetabolismus. PcpS zeigt im Vergleich zu Sfp umgedrehte Selektivität und verhält sich mit ACP wie eine PPTase des Primärmetabolismus. CP des Sekundärmetabolismus werden im Gegensatz zu AcpS zwar erkannt und modifiziert, allerdings mit vergleichsweise geringer Effizienz.

6.1.2.6 Bedeutung von PcpS für Primär- und Sekundärmetabolismus

Die Charakterisierung von PcpS *in vivo* mit Hilfe des Hefe *two-hybrid system* und *in vitro* mit verschiedenen CP hat gezeigt, dass die PPTase PcpS in der Lage ist, sowohl CP des Primär- als auch des Sekundärmetabolismus zu modifizieren. Dies beantwortet allerdings nicht die Frage, ob PcpS sowohl im Fettsäure- als auch im Siderophormetabolismus eine essentielle Rolle spielt. Um dies zu klären, wurde in Zusammenarbeit mit Max Schobert (TU Braunschweig) eine Deletion des zugehörigen Gens, *PA1165*, versucht. Dazu wurde der Deletionsvektor $\Delta pcpS$ in Konjugationsexperimenten mit *P. aeruginosa* verwendet. In diesem Vektor ist das *PA1165* Gen durch eine Gentamycin-Resistenzkassette ersetzt, die von homologer DNA flankiert wird. PCR Analyse der Konjuganten zeigte die Anwesenheit von sowohl dem mutierten, als auch dem Wildtyp-Gen in allen Mutanten, die sowohl gentamycinsensitiv, als auch carbenicillin- und sucroseresistent waren. Dies deutet darauf hin,

dass das für PcpS kodierende Gen essentiell ist und nicht deletiert werden kann. Als Alternative zu einem *PA1165*-negativen Genotyp wurde eine Untersuchung mit antisense-RNA angestrebt. Dazu trug *P. aeruginosa* entweder ein Konstrukt, von dem ein Teil der *PA1165* mRNA (sense-RNA) oder zur *PA1165* mRNA komplementäre (antisense-RNA) unter Induktionsbedingungen mit IPTG transkribiert werden konnte. Die antisense-RNA sollte *in vivo* an die mRNA des *PA1165* Gens binden. Diese dsRNA wird anschließend von der RNase III abgebaut. Stämme, die das sense-RNA-Konstrukt trugen, sollten jedoch unbeeinflusst bleiben. Ohne Induktion durch IPTG wuchsen die Stämme erwartungsgemäß ähnlich gut wie der Wildtyp. Unter Induktionsbedingungen war das Wachstum des Stamms mit antisense-Konstrukt wie erwartet schlechter als das aller übrigen. Dies zeigt, dass die künstlich generierte antisense-RNA die Ziel-mRNA bindet und zum Abbau der dsRNA führt. Der beobachtete Phänotyp deutet, wie auch der Deletionsversuch des Gens, darauf hin, dass *PA1165* für *P. aeruginosa* eine essentielle Rolle spielt. Die Länge der generierten antisense-RNA sowie die Struktur spielen eine wichtige Rolle für die Effektivität dieser Interaktion (158). Da der hier zu beobachtende Phänotyp noch nicht besonders deutlich ist, müsste das antisense-Konstrukt noch verbessert werden. Möglicherweise reicht die Einführung einer Terminationsschleife aus. Diese fehlt im hier vorgestellten Konstrukt und führt möglicherweise zur Transkription einer antisense-RNA, die länger ist, als die gewünschten 100 bp. Längere antisense-RNA hat meist eine niedrigere Affinität zur Ziel-mRNA und führt zu einem weniger deutlichen Phänotyp.

In Konsequenz sollte PcpS also eine funktionelle Rolle in der essentiellen Fettsäuresynthese spielen. Darüber hinaus boten BLAST Untersuchungen des *P. aeruginosa* Genoms keinen Anhaltspunkt für die Präsenz einer weiteren Sfp-Typ PPTase. Dies impliziert, das PcpS auch für den Siderophormetabolismus gebraucht wird.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzige PPTase von *P. aeruginosa*, PcpS, zwar mit *E. coli* EntD und Sfp von *B. subtilis* verwandt ist, aber entscheidende Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften aufweist, die es von anderen Enzymen der PPTasen-Superfamilie abgrenzen. Daher ist PcpS der erste Vertreter einer neuen Untergruppe von PPTasen, die eine putativ ähnliche Struktur wie Sfp aufweisen, aber während der Evolution auf hohe katalytische Effizienz mit CP des Primärmetabolismus selektiert wurden. Eine Kristallstruktur von PcpS wäre daher ein wichtiger Beitrag, um in diesem Fall eine Entscheidung zu fällen.

6.1.2.5 PcpS als Target für Antibiotika

Das Chromosom von *B. subtilis* trägt die Sequenzinformation für die Dhb NRPS. Diese NRPS produziert normalerweise das katecholische Siderophor Bacillibactin (25). *B. subtilis* MR168 besitzt jedoch ein defektes *sfp* Gen, daher bleiben alle NRPS im inaktiven *apo*-Zustand und das Siderophor kann nicht produziert werden. *P. aeruginosa* produziert zwei Siderophore, nämlich Pyoverdin und Pyochelin, die mit der hohen Virulenz des Bakteriums assoziiert sind (26-28,177). Beide Siderophore werden nichtribosomal produziert, daher ist die Produktion von der *apo*- zu *holo*-Umwandlung der zugehörigen NRPS durch die enzymatische Aktivität von PcpS abhängig. Daher stellt PcpS ein exzellentes Target für Antibiotika dar. Die selektive Inhibierung des Enzyms könnte einen wichtigen Beitrag zur Eindämmung von Infektionen leisten, die *P. aeruginosa* verursacht. Da die katalytische Effizienz mit CP des Sekundärmetabolismus wenigstens 20 mal niedriger ist, als mit dem FAS ACP wäre es denkbar, dass durch partielle Inhibierung von PcpS lediglich die Siderophorsynthese betroffen ist. Dies würde zwar nur einen bakteriostatischen Effekt auf *P. aeruginosa* haben, aber auch die Wahrscheinlichkeit von Resistenzen herabsetzen. Erste Tests mit dem potentiellen Inhibitor α,β -Methylenadenosin-5'-diphosphat (MADP) waren allerdings erfolglos. Dieses Molekül ist ein 5'-Adenosindiphosphat Analogon, dessen Phosphatreste eine verbrückende Methylengruppe statt eines Sauerstoffatoms enthalten. Diese Bindung wird normalerweise von PPTasen gespalten. Daher wurde erwartet, dass das Molekül im aktiven Zentrum verbleibt und die Katalyse beeinflusst. Für die Bindung von CoA ist allerdings auch das 3'-Phosphat wichtig. Aus diesem Grund wäre MADP mit zusätzlichem 3'-Phosphat vermutlich besser geeignet. Jenseits des β -Phosphats von CoA findet im Fall von Sfp-Typ PPTasen enzymseitig keine Bindung mehr statt (Abb. 62), daher ist zu vermuten, dass dieser Teil von CoA für das Inhibitor-Design keine Rolle spielt.

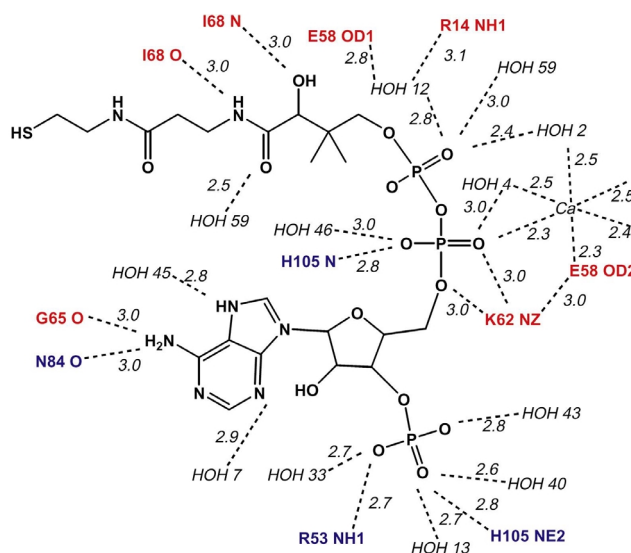


Abb. 62: Bindung von CoA am Beispiel von *B. subtilis* AcpS. Das Enzym koordiniert vor allem die drei Phosphatreste und den Purinring des Adenins. Eine Koordination der 4'PP Einheit von CoA (wie hier durch I68) findet in Sfp-Typ PPTasen nicht statt. Abbildung nach (78).

6.1.3 Evolution der PPTasen

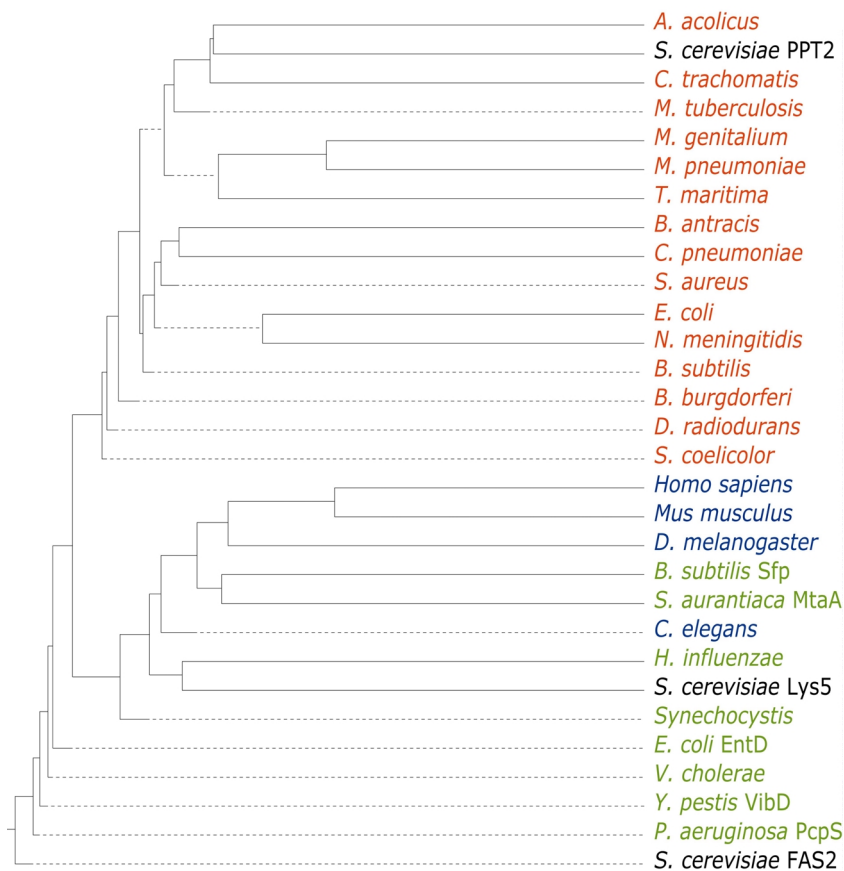


Abb. 63: Phylogenetischer Baum der PPTasen. Die Sequenzen der PPTasen wurden mit CLUSTAL ausgerichtet. Mit Ausnahmen sind AcpS-Typ PPTasen rot, Sfp-Typ PPTasen grün dargestellt. Die *S. cerevisiae* PPTasen (schwarz) gehören entweder zum AcpS-Typ (FAS2, PPT2) oder zum Sfp-Typ (Lys5). Die tierischen PPTasen (blau) gehören dem Sfp-Typ an.

Die Kristallstrukturen von *B. subtilis* AcpS und Sfp weisen darauf hin, dass zwischen beiden PPTasen eine gewisse Ähnlichkeit besteht. Ungeachtet der geringen Ähnlichkeit auf Proteinebene (14%) hat eine Superposition der beiden Strukturen gezeigt, dass die beiden Hälften des pseudohomodimeren Sfp dem AcpS-Monomer ähneln (83). Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Sfp-Typ PPTasen durch Genfusion entstanden sind. Meine biochemischen Studien an AcpS, Sfp und PcpS zeigen weiterhin, dass zwischen den PPTasen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Selektivitäten für CP des Primär- und Sekundärmetabolismus bestehen. Die biochemische Charakterisierung von *E. coli* AcpS und EntD zeigten dies ebenfalls (70). AcpS-Typ PPTasen sind demnach für die Modifikation der CP des Primärmetabolismus optimiert und erkennen die CP des Sekundärmetabolismus nicht. Sfp und EntD modifizieren hingegen die CP des Sekundärmetabolismus mit hoher Effizienz. PcpS ist zwar auch eine Sfp-Typ PPTase mit breiter Substrattoleranz, wurde jedoch evolutiv für die Modifikation der CP des Primärmetabolismus optimiert. *P. aeruginosa* kommt also mit PcpS als einziger PPTase aus. Andere Bakterienstämme zeigen, dass diese Entwicklung kein Einzelfall ist (s. Einleitung). Stämme, die eine Sfp-Typ PPTase besitzen, können ohne

eine AcpS-Typ PPTase auskommen. In höheren Organismen scheint sich diese Entwicklung fortgesetzt zu haben (Abb. 63). *S. cerevisiae* besitzt noch drei PPTasen: PPT2 ist eine AcpS-Typ PPTase, die für den Fettsäurestoffwechsel der Mitochondrien zuständig ist; die integrierte PPTase der Fettsäuresynthese ist ebenfalls eher mit den AcpS-Typ PPTasen verwandt, wohingegen Lys5 eine Sfp-Typ PPTase ist, die nur für die Lysinbiosynthese gebraucht wird. Wie nach der hier aufgestellten Theorie zu erwarten, haben *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *M. musculus* sowie *C. elegans* nur noch eine PPTase vom Sfp-Typ (Abb 63). Die Situation in Hefe scheint zunächst im Widerspruch dazu zu stehen, dass AcpS-Typ PPTasen im Verlauf der Evolution verloren gegangen sind. Nach der Endosymbiontentheorie (178) waren Mitochondrien und Chloroplasten ursprünglich selbständige Mikroorganismen, die von anderen Zellen als Symbionten rekrutiert wurden. Unter diesen Voraussetzungen ist es denkbar, dass die AcpS-Typ PPTasen der Hefe einem Bakterium entstammen. Im Verlauf der Evolution sind diese dann verloren gegangen, was der heute zu beobachtenden Situation in höheren Organismen entspricht.

6.1.4 PPTase-CP Wechselwirkung: Das hPCP

6.1.4.1 Konstruktion und biochemische Charakterisierung des hPCP

Die oben beschriebenen biochemischen Charakterisierungen verschiedener PPTasen zeigten in vielen Fällen eine Diskriminierung zwischen verschiedenen Typen von CP, sowohl absolut, als auch im Hinblick auf katalytische Effizienz. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Determinante für diese Unterschiede im CP zu suchen ist.

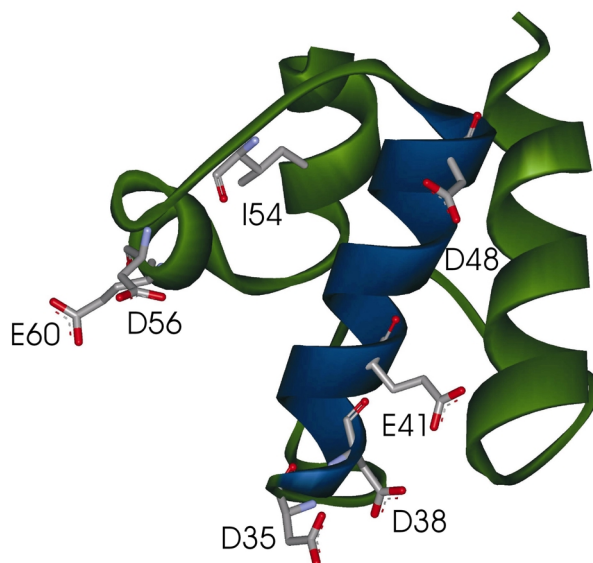


Abb. 64: Kristallstruktur von B.s.-ACP. Gezeigt sind die Reste D35, D38, E41, D48, I54, D56 und E60, die für die erfolgreiche Interaktion zwischen AcpS und ACP verantwortlich sind. Die meisten davon befinden sich in der blau markierten Helix 2 des CP.

Die Cokristallstruktur von *B. subtilis* AcpS mit seinem natürlichen ACP Substrat ermöglichte detaillierte Einblicke in die Wechselwirkung zwischen der PPTase und seinem Substrat (78). Die Interaktion zwischen dem basischen AcpS und dem sauren ACP ist hauptsächlich hydrophiler Natur. Das Interface zwischen den beiden Proteinen besteht hauptsächlich aus Helix 1 von AcpS und Helix 3 von ACP (Abb. 64). Eine ähnliche Interaktion konnte auch für die Wechselwirkung des *E. coli* FAS ACP und die β -Ketoacyl-ACP Synthase III (FabH) durch eine Kombination aus Computeranalyse und ortsgerichteter Mutagenese nachgewiesen werden (100). Auch hier fanden sich die meisten wechselwirkenden ACP Reste im Bereich der Helix 2. Dies machte die Helix 2 des CP zum vielversprechenden Kandidaten als Determinante, die von anderen Proteinen wie den PPTasen zur Unterscheidung verwendet wird. Die NMR Struktur der *E. coli* und *B. subtilis* FAS ACP, des *S. coelicolor* Actinorhodin PKS ACP sowie des *B. brevis* TycC3-PCP sind sich alle sehr ähnlich (35,62,167,179). Es handelt sich in allen Fällen um sog. Vierhelix-Bündel. Vertreter dieser Proteinsuperfamilie werden vor allem durch zwei strukturelle Motive charakterisiert: Das am stärksten konservierte Strukturmotiv dieser Proteinsuperfamilie ist Helix 2. Die Länge der anderen Helices kann variieren und nur Helix 1 und 4 nehmen eine konstante Orientierung zu Helix 2 ein (antiparallel bzw. parallel). Der größte Unterschied zwischen den Mitgliedern dieser Superfamilie besteht im elektrostatischen Oberflächenpotential in der Umgebung des invarianten Serin und der anschließenden Helix 2. Außerdem ist der pI der Protein sehr unterschiedlich; das saure B.s.-ACP hat einen pI von 3.8, während TycC3-PCP mit 7.6 eher neutral ist. Die zugehörigen PPTasen, d.h. AcpS des Primärmetabolismus und Sfp des Sekundärmetabolismus haben ebenfalls gegensätzliche pI von 9.6 bzw. 5.6. Wie ist also die Interaktion zwischen PPTase und CP geregelt? Zum einen konnte die AcpS-ACP Cokristallstruktur den Hinweis auf die Interaktion der PPTase mit Helix 2 von ACP geben, und, falls dies generalisiert werden kann, mit der entsprechenden Region (Helix 2) von PCP. Zum anderen haben Sequenzalignments (s. Einleitung) gezeigt, dass Helix 2 ein sehr konstantes Strukturelement der verschiedenen CP Subfamilien (ACP, PCP^C und PCP^E) ist, dessen Aminosäuresequenz jedoch zwischen den einzelnen Spezies sehr unterschiedlich ist. Daher ist die Wahl des CP Substrats durch eine PPTase vermutlich durch Unterschiede in Ladung und Hydrophobizität dieser Helix geregelt. Allerdings könnten auch die Gesamtladung des CP sowie sterische Gründe dafür mitverantwortlich gemacht werden. Durch den Austausch von Helix 2 des TycC3-PCP durch die entsprechende Region von B.s.-ACP wurde ein neues CP geschaffen, das hPCP (Abb. 65).

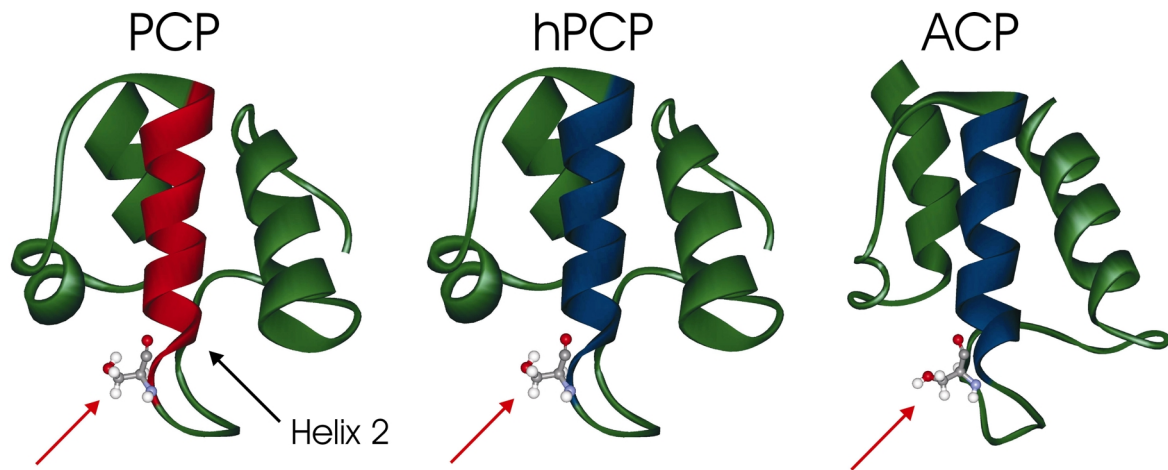


Abb. 65: Strukturen der verwendeten CP. Dargestellt sind die Strukturen des TycC3PCP (PCP), des B.s.-ACP (ACP) sowie die vorgeschlagene Struktur für hPCP. Die Helix 2 ist im Fall von PCP rot eingefärbt. Diese Helix wurde durch den entsprechenden (hier blau eingefärbten) Bereich von ACP ersetzt. Der rote Pfeil markiert den invarianten Serinrest.

6.1.4.2 Modifikation von hPCP durch AcpS und Sfp

Dieses neue CP wird immer noch von Sfp erkannt und nun zum ersten Mal auch durch AcpS. Die biochemische Charakterisierung von Sfp mit hPCP als Substrat zeigte, dass der k_{cat}/K_m für hPCP zwischen dem für B.s.-ACP und TycC3-PCP liegt. Dies entspricht einer sechsfachen Verringerung der katalytischen Effizienz verglichen mit TycC3-PCP und einer 12-fachen Verbesserung im Vergleich mit B.s.-ACP. Die k_{cat} -Werte von Sfp für hPCP und PCP sind gleich, während er sich im Vergleich mit dem für B.s.-ACP etwa um den Faktor acht verbessert hat (83,168). So ist das hPCP für Sfp offensichtlich ein besseres Substrat, als B.s.-ACP. Aufgrund dieser Befunde scheint hPCP mit PCP näher verwandt zu sein, als mit B.s.-ACP. Dies ist nicht verwunderlich, da etwa 84% der AS des hPCP dem PCP entstammen. Daher war auch zu erwarten, dass hPCP ein schlechteres Substrat für AcpS ist, als B.s.-ACP. Zwar ist K_m -Wert von AcpS für hPCP um den Faktor drei niedriger, als für B.s.-ACP, und vergleichbar mit dem K_m von Sfp für hPCP, der k_{cat} ist allerdings zehn mal niedriger. Dies entspricht einer dreifachen Verringerung der katalytischen Effizienz von AcpS für hPCP verglichen mit dem natürlichen Substrat B.s.-ACP. Diese Werte vermitteln auf den ersten Blick den Anschein, dass die Modifikation durch AcpS zu niedrig ist, als dass hPCP ein PCP oder ACP ersetzen könnte. Allerdings ist die Effizienz der Modifikation von B.s.-ACP durch Sfp mit $0.3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ noch drei mal geringer, reichte aber aus, um B.s.-ACP *in vivo* ausreichend zu modifizieren (94). Daher kann man vermuten, dass hPCP einem universellen CP am Nächsten kommt.

6.1.4.3 Weitergehende Untersuchungen mit hPCP

Weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass sich das hPCP auch im Modulverband mit A-, C- und E-Domänen verwenden lässt (83,168). Zum einen wurde ein mit dem hPCP ausgestattetes TycA (hTycA, bestehend aus A-, hPCP- und E-Domäne) *in vivo* je nach Expressionsdauer stärker modifiziert, als das Wildtyp-TycA. Zum anderen war die Kommunikation zwischen der hPCP- und A-Domäne mit Einschränkung noch intakt. Lediglich die E-Domäne akzeptierte das hPCP nicht als Substrat. Außerdem konnte das hTycA zum ersten mal auch *in vitro* von AcpS modifiziert werden, wohingegen das Ausgangskonstrukt TycA von AcpS nicht erkannt wird. Die Untersuchungen an hTycA bestätigen zum einen, dass auch im Fall der A- und E-Domäne die Helix 2 des hPCP als Erkennungsstelle dient, zum anderen das Modell, nachdem PCP stromaufwärts von E-Domänen eine Besonderheit darstellen, und nicht durch andere PCP ersetzt werden können (46).

Es wurde angenommen, dass ein Grund für die mangelnde Erkennung von PCP Substraten durch AcpS in der aktiven Tasche zu suchen ist. Diese ist im Vergleich mit Sfp enger und tiefer (78,80-82). Dies lässt vermuten, dass die multimodularen NRPS schon aufgrund ihrer Größe nicht in diese aktive Tasche passen. Die Untersuchungen zur Modifikation von hTycA *in vitro* und *in vivo* zeigen jedoch, dass die Polarität der aktiven Tasche eine größere Rolle spielt, als strukturelle Voraussetzungen.

Untersuchungen zur Kommunikation mit TycB1 (C-A-PCP), dem natürlichen Proteinpartner von TycA (A-PCP-E) zeigten, dass das Dipeptidprodukt auch mit hTycA nachgewiesen werden kann, wenn auch nicht im gleichen Umfang, wie mit TycA. Daher kann angenommen werden, dass nicht nur die E-Domäne für die Kommunikation zwischen den beiden Synthetasen verantwortlich ist (39,47), sondern eher eine Kombination aus E-Domäne und PCP für den erfolgreichen Transfer der D-AS notwendig zu sein scheint.

Das hPCP scheint also geeignet, um ein PCP, zumindest in Modulen, die keine E-Domäne enthalten, zu ersetzen. Dadurch könnten ohne Coexpression von *sfp* (oder postexpressionaler Modifikation *in vitro*) in *E. coli* vollständig modifizierte *holo*-NRPS erhalten werden. Außerdem könnten hPCP-Domänen gezielt fehlbeladen werden, um z.B. die Substratspezifität von C- und Cy-Domänen zu testen. Da PPTasen auch CoA-Derivate als Substrat akzeptieren (74), wäre es denkbar hPCP- oder PCP-Domänen gezielt mit einer bestimmten AS zu beladen. Soll hPCP beladen werden, würde AcpS zur Modifikation mit einem AS-CoA Derivat eingesetzt; PCP-Domänen ließen sich anschließend mit Sfp in gleicher Weise modifizieren.

6.1.5 Mutationsanalyse von AcpS

6.1.5.1 Modell der CP Erkennung durch PPTAsen

Die drastische Methode im Falle des hPCP hat gezeigt, dass PCP Substrate sich so verändern lassen, dass eine Interaktion mit AcpS erfolgreich verläuft. Eine etwas genauere Analyse (83) zeigte, dass auch eine einzelne Mutation des AS-Rests K47 von TycC3-PCP zu Asparat ausreichend ist, um eine Modifikation durch AcpS zu ermöglichen. Die AcpS-ACP Cokristallstruktur konnte außerdem zeigen, dass sich der äquivalente ACP-Rest, D38, in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zu den AcpS-Resten R14 und K44 befindet. Die den AcpS R14 und K44 äquivalenten Sfp-Reste wurden durch Superposition der AcpS- und Sfp-Kristallstrukturen bestimmt (83). Demnach interagieren die Sfp-Reste K112 und D40 mit PCPs Rest K47. Durch Mutationsanalyse dieser Sfp-Reste zu Alanin bzw. Lysin konnte ihre Bedeutung für diese Wechselwirkung nachgewiesen werden (83). Die Sfp Mutanten K112A, D40A und D40K modifizierten PCP mit einer katalytischen Effizienz, die im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um die Faktoren 68, 6.5 bzw. 29 erniedrigt war und somit eine wichtige Rolle in der PCP Erkennung spielen sollten.

Diese Mutationen führten zu einem Modell, wonach Sfp das D38 von ACP bzw. K47 von PCP mit seinen Resten K112 und D40 erkennt. Jedoch verwendet Sfp je nach CP entweder die elektrostatische K112-D38 Wechselwirkung oder die D40-K47 Interaktion und kann so beide CP-Typen erkennen. Zwar wurde durch Mutation des K47 gezeigt, dass dies die wichtigste Wechselwirkung ist, allerdings nicht die Einzige. Sfp scheint eine flexible Schleife für die Erkennung des CP zu verwenden, die sich den unterschiedlichen CP-Typen gut anpassen kann (83). Allerdings ist damit offensichtlich trotz allem ein gewisser Verlust an Effizienz verbunden, wenn es sich um CP des Primärmetabolismus handelt. AcpS hingegen benutzt eine Helix zur Interaktion mit dem CP, die eine starre Struktur aufweist und vermutlich zur absoluten Diskriminierung zwischen CP-Typen beiträgt. In Abb. 66 ist ein Modell für die Wechselwirkung der Reste R14 und K44 mit D38 von ACP bzw. K47 von PCP gezeigt. Nach diesem Modell finden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen diesen drei Resten nur im Fall des ACP statt. Da die Reste in diesem Fall entgegengesetzt geladen sind kann D38 sowohl mit R14, als auch mit K44 eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen, während das positiv geladene K47 abgestoßen wird.

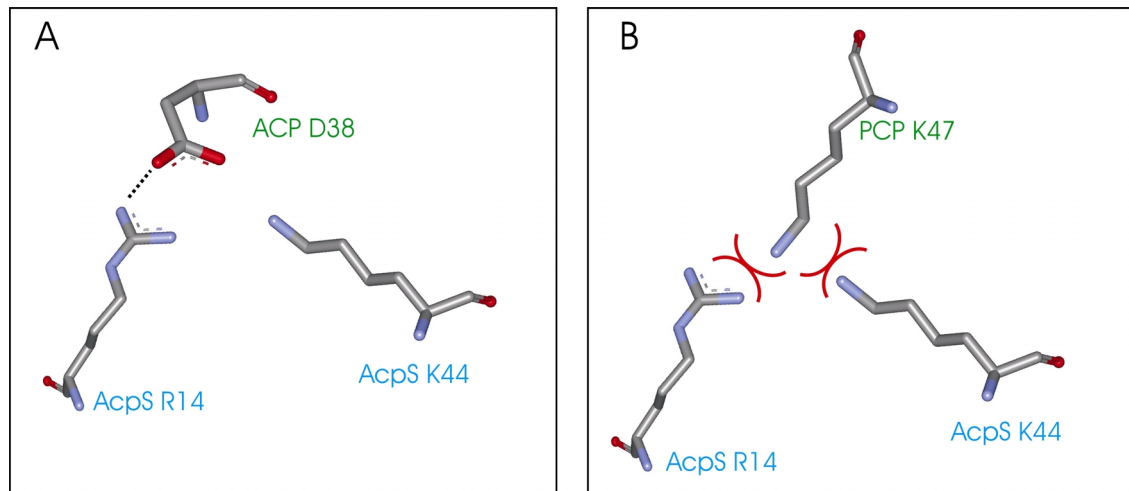


Abb. 66: Modell der Interaktion zwischen AcpS und B.s.-ACP bzw. TycC3-PCP. A. D38 von ACP kann sowohl mit dem AcpS Rest R14, als auch K44 Wasserstoffbrücken bilden, wohingegen B. Rest K47 von PCP wegen gleicher Ladung abgestoßen wird. Abbildung nach Mofid (83).

6.1.5.2 Anpassung von AcpS an das PCP Substrat

Die Mutation der AcpS Reste R14 und K44 führt zunächst einmal zum Verschwinden der zwei K_m -Werte für niedrige und hohe CP Konzentrationen in allen Fällen außer R14K. Das Enzym scheint durch Mutation dieser Reste weniger flexibel geworden zu sein und kann die Reaktion nicht mehr nach dem vorgeschlagenen, allosterischen Mechanismus (80,94) katalysieren. Außerdem ist der K_m aller Mutanten mit B.s.-ACP auf den gleichen Wert gesunken, den Sfp mit B.s.-ACP hat. Dies lässt vermuten, dass R14 und K44 die gleiche Funktion bekleiden, wie K112 und D40 in Sfp. Der Vergleich der katalytischen Effizienz zeigt die Wichtigkeit dieser beiden Reste für die CP Erkennung. In beiden Fällen ist die katalytische Effizienz der Alaninmutanten gesunken. Die Effizienz der R14A Mutante ist zweifach niedriger, die der K44A Mutante sogar fast siebenmal niedriger, als der Wildtyps. Außerdem ist der K_m von K44A mit 120.5 μM fast doppelt so hoch, wie der des Wildtyps. Dies zeigt zum einen, dass K44 für die Erkennung eine größere Rolle spielt, als R14, zum anderen können die Reste vermutlich die Funktion des jeweils anderen übernehmen, so dass Mutationen in einem Rest teilweise kompensiert werden können. Dies wird auch durch die Mutante K44D unterstrichen. Nach dem Modell müsste der Aspartatrest eine abstoßende Wirkung auf ACP haben, was sich in einer dreifach erniedrigten katalytischen Effizienz und einem k_{cat} -Wert ausdrückt, der um den Faktor zehn gefallen ist. Diese Mutation führt jedoch nicht zur totalen Diskriminierung, die K_m - und k_{cat} -Werte sind vielmehr dieselben, die Sfp für B.s.-ACP hat. Wie im Fall von Sfp befindet sich bei AcpS K44D nämlich ein positiv und ein negativ geladener Rest an dieser Stelle.

Die Mutante R14K stellt in gewisser Hinsicht eine Besonderheit dar. Zum einen ist einzig bei ihr das Phänomen der zwei K_m - und k_{cat} -Werte erhalten geblieben, zum anderen unterscheiden sich die katalytischen Effizienzen kaum vom Wildtyp. Für niedrige Konzentrationen ist zwar eine Verringerung um 8.6 zu verzeichnen, die Effizienz für hohe Konzentrationen ist jedoch sogar dreifach erhöht. Dies zeigt, dass diese recht konservative Mutation erwartungsgemäß wenig Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften von AcpS hat. Außerdem scheint diese Mutation mit dem für hohe Konzentrationen niedrigem K_m von 25.8 μM und hohem k_{cat} von 153.5 min^{-1} sogar eine Verbesserung darzustellen.

Die Doppelmutante R14KK44D imitiert die Situation K112/D40 von Sfp. Es konnte daher erwartet werden, dass K47 von TycC3-PCP nun nicht mehr elektrostatisch abgestoßen wird. Der Test mit radioaktiv markiertem CoA verlief jedoch negativ. Selbst nach 18 h konnte keine erhöhte Modifikation von TycC3-PCP im Vergleich zu AcpS gemessen werden. Da sowohl bei pH 8.8 (pH-Optimum von AcpS) sowie pH 6.0 (pH-Optimum von Sfp) gemessen wurde, kann ausgeschlossen werden, dass sich das pH-Optimum der Mutanten verändert hat: Alle Mutanten modifizierten B.s.-ACP bei pH 6.0 in geringerem Maße, als bei pH 8.8. Erstaunlicher Weise konnte selbst bei AcpS eine Modifikation von TycC3-PCP gemessen werden. Sie lag zwar nur um den Faktor 5.5 über der Reaktion ohne PPTase, zeigt aber, dass die Diskriminierung zwischen CP durch AcpS nicht so strikt ist, wie zunächst angenommen.

Die Tatsache, dass die AcpS Doppelmutante R14KK44D TycC3-PCP nicht modifiziert zeigt jedoch, dass zur CP Erkennung noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Es ist möglich, dass die starre Helix von AcpS nicht ausreichend in der Lage ist, sich dem anderen CP-Typ anzupassen. Auch könnte die Ursache für die Diskriminierung z.T. im CP zu suchen sein. ACP müssen sich naturgemäß einer Vielzahl von verschiedenen Proteinpartnern und Substraten anpassen und es muss von ihnen daher eine höhere Flexibilität erwartet werden. Tatsächlich konnte für das FAS ACP von *Mycobacterium tuberculosis* ein unstrukturierter C-Terminus nachgewiesen werden, der möglicherweise der Anpassung an verschiedene Fettsäuresubstrate dient (64). Außerdem scheint die Erkennungshelix 2 des ACP einer ständigen Umstrukturierung unterworfen zu sein (103), die möglicherweise einer Anpassung an den jeweiligen Proteinpartner dient. PCP befinden sich hingegen in einem starren Proteinverband. Da die nichtribosomale Proteinbiosynthese gerichtet erfolgen muss, wird von ihnen eher eine gewisse Starrheit erwartet, da sie immer mit den gleichen Partnern interagieren. Eine Wechselwirkung mit Domänen weit entfernter Module ist hier nicht gewünscht. Untersuchungen zur Flexibilität des PCP wären daher ein wichtiger Beitrag, um diese Frage zu klären.

6.2 Inhibitoren für A-Domänen

Sulfamoyl Adenylat Analoga eignen sich zur Inhibierung von tRNA Synthetasen und A-Domänen gleichermaßen gut (85,115,119). Dies hat man sich zunutze gemacht, um den Reaktionsmechanismus von tRNA Synthetasen zu untersuchen (106,118). Diese Inhibitoren haben jedoch größeres Potential. Sie könnten zur gerichteten Evolution von A-Domänen eingesetzt werden, aber auch zur Termination von NRPS-Stoffwechselwegen wären sie einsetzbar.

6.2.1 Inhibierung der D-Alanylierung der Gram-positiven Zellwand

DltA und DCP sind beide in den D-Ala Transfer auf Teichonsäuren der Gram-positiven Zellwand beteiligt. Für die Synthese von D-Alanyl-Lipoteichonsäuren wird die 57 kDa D-Ala-D-Ala Carrier Protein Ligase (DltA) und das 10 kDa D-Alanyl Carrier Protein (DCP) benötigt. D-Ala wird zunächst von DltA als Aminoacyladenylat aktiviert und dann kovalent mit dem 4'-PP des DCP verknüpft. Beladenes DCP kann D-Ala anschließend an Lipoteichonsäuren weitergeben, um die Oberflächenladung des Bakteriums zu modulieren. DltA konnte sowohl mit D-Ala, als auch mit seinem natürlichen Proteinpartner DCP charakterisiert werden. Damit wurde zum ersten Mal ein K_m -Wert von einer A-Domäne für ein CP bestimmt.

Die Inhibitoren, die erfolgreich für die Inhibierung von PheA und LeuA eingesetzt wurden (85) hatten gezeigt, dass durch Variation der Aminosäure, die mit der Adenylsulfamoyleinheit gekoppelt wird, ein spezifischer Inhibitor für verschiedene A-Domänen gewonnen werden kann. Mit dem von N. Bandur hergestellten D-Ala-Inhibitor konnte erneut bestätigt werden, dass geringe Veränderungen in der Synthese genügen, um Adenylatanaloga-Inhibitoren für jede A-Domäne zu synthetisieren.

6.2.1.1 Charakterisierung von DltA

Zunächst konnte von Th. Weber gezeigt werden, dass DltA, wie erwartet, D-Ala aktiviert und nur geringe Nebenselektivität für die nicht proteinogene AS D-Abu aufweist. Besonders die Tatsache, dass L-Ala nicht von DltA aktiviert wird belegt, dass sowohl tRNA Synthetasen als auch A-Domänen nicht nur zwischen verschiedenen AS, sondern auch zwischen Enantiomeren unterscheiden. Neben der experimentellen Bestimmung der AS-Selektivität, bietet auch der nichtribosomale Code die Möglichkeit, die Substratselektivität

vorherzusagen. Beide Methoden lieferten unabhängig voneinander dasselbe Ergebnis. Dadurch konnte der nichtribosomale Code erneut bestätigt werden. Der K_m -Wert für D-Ala lag mit 13.62 μM im selben Bereich, wie er auch für andere A-Domänen gefunden wird (34,85).

Die Sequenzidentität zwischen DCP sowie B.s.-ACP und PCP ist mit 17.9% bzw. 2.6-6.8% niedrig. Daher war die eindeutige Zuordnung von DCP zum Primär- oder Sekundärmetabolismus schwierig. Da DCP mit der Zellwand assoziiert ist, sollte es allerdings eher dem Primärmetabolismus zugeordnet werden. Die Phosphopantetheinylierung durch die PPTase des Primärmetabolismus, AcpS, bestätigt diese Vermutung. Auch wenn die k_{cat} -Werte für AcpS und Sfp im gleichen Bereich liegen, sind die K_m -Werte und die katalytische Effizienz mit Sfp deutlich erniedrigt. Die katalytische Effizienz von AcpS ist sogar mehr als zehn mal so hoch, wie mit hohen B.s.-ACP Konzentrationen, allerdings auch mehr als sechs mal niedriger verglichen mit niedrigen B.s.-ACP Konzentrationen. Während die Konzentration von DCP in der Zelle unbekannt ist, ist B.s.-ACP eines der häufigsten Protein in *B. subtilis*. Daher ist ein niedriger K_m -Wert zur Modifikation von B.s.-ACP eher unwichtig. Der K_m von AcpS mit DCP zeigt jedoch, dass DCP verglichen mit B.s.-ACP das bevorzugte Substrat darstellt. Auf diese Weise kann *B. subtilis* die D-Ala Modifikation der Zellwand aufrecht erhalten, auch wenn die intrazelluläre Konzentration von DCP relativ niedrig ist. Das Gesamtbild deutet demnach ebenfalls auf eine Zugehörigkeit von DCP zum Primärmetabolismus hin.

In anderen Organismen wurde bereits gezeigt, dass DCP das kognate Proteinsubstrat von DltA darstellt (75,123,126,127). Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass DCP in *B. subtilis* von DltA modifiziert wird. Diese Modifikation erfolgt mit hoher Effizienz, wie sie typischer Weise für diffusionskontrollierte Reaktionen gemessen wird ($1.01 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$). Allerdings wird B.s.-ACP ebenfalls von DltA modifiziert. Der K_m dieser Reaktion konnte nicht gemessen werden, da der Sättigungsbereich nicht erreicht wurde. Dies deutete schon auf eine Präferenz von DltA für DCP hin. Da für DltD aus *Lactobacillus casei* gezeigt werden konnte, dass es Thioesteraseaktivität gegenüber D-Ala-ACP hat (127), ist zu vermuten, dass es sich bei der Beladung von ACP durch DltA um ein Artefakt handelt.

6.2.1.2 Inhibierung von DltA

J. May konnte zeigen, dass der von N. Bandur synthetisierte Inhibitor **7** (Abb. 67) *in vitro* DltA mit ähnlichem K_i inhibiert, wie dies zuvor für andere A-Domänen/Inhibitorkombinationen gezeigt wurde (85). Außerdem konnte er zeigen, dass weder PheA noch die Carboxysäure-aktivierende A-Domäne DhbE (107) von **7** beeinflusst

wurden, so dass die Spezifität des Inhibitors gesichert war. Der Vergleich des K_i mit dem K_m für D-Ala (232 nM bzw. 13.63 μ M) zeigt besonders deutlich das Maß der Inhibierung, da zwischen beiden ein Faktor von 60 liegt.

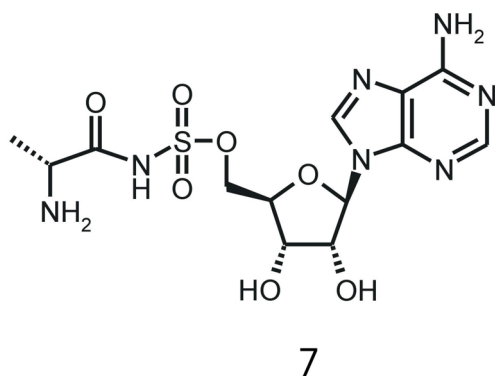


Abb. 67: Inhibitor für DltA. Es handelt sich bei diesem Inhibitor um das D-Ala Derivat des nicht hydrolisierbaren Sulfamoyl-Adenylatanalogon, wie sie auch schon für andere A-Domänen verwendet wurden.

Ascamycin ist das 2-chloro Ala-Sulfamoyl Adenylatanalogon von 7. Diese Substanz ist ein Nukleosidantibiotikum, das im Fermentationsmedium von *Streptomyces* gefunden wird (120). Es war daher vorstellbar, dass 7 in der Lage ist, die bakterielle Zellwand zu überwinden, um das Zielmolekül, DltA, zu erreichen. Es war in diesem Fall ein Phänotyp zu erwarten, der einer *dltA*-Deletionsmutante gleich kommt. Phänotypen von verschiedenen bakteriellen Stämmen sind in der Vergangenheit beschrieben worden. *S. aureus* zeigt beispielsweise eine veränderte Zellmorphologie und ist dreimal sensitiver gegenüber dem Peptidantibiotikum Vancomycin (128). *B. subtilis* ist unter diesen Bedingungen empfindlicher gegenüber endogenen lytischen Enzymen (Autolyse) sowie β -Lactam Antibiotika (129,180). Diese Daten stehen im Einklang mit unseren Erfahrungen, dass *B. subtilis* in direkter Korrelation mit verschiedenen Konzentrationen (0.5-4 μ M) von 7 einen sichtbaren Hemmhof auf Festmediumplatten sowie verlangsamtes Wachstum in Flüssigkultur zeigt. Darüber hinaus konnte J. May zeigen, dass das Wachstum des Gram-negativen Kontrollstamms *E. coli* K12, wie erwartet, erst durch deutlich höheren Konzentrationen von 7 beeinflusst wurde. Verlangsamtes Wachstum konnte ab Konzentrationen von 10 μ M beobachtet werden. Dieser Effekt verschwand bei Konzentrationen von 4 μ M. Die Zellmorphologie von *E. coli* wurde jedoch nicht verifiziert.

Um den Effekt von Vancomycin und Ampicillin auf den Wildtyp *B. subtilis* JH642 sowie den *dltA* Deletionsstamm zu testen, wurde eine Agarplattenassay eingesetzt. Im Einklang mit anderen Studien zeigte der Deletionsstamm einen leicht vergrößerten Hemmhof mit beiden Antibiotika. Wurden im gleichen Assay zusätzlich zu Vancomycin unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors 7 eingesetzt, war der Phänotyp des Wildtyp *B. subtilis* tendenziell vergleichbar dem der Deletionsmutante ohne Zugabe des Inhibitors,

während *B. subtilis* JH642 Δ dltA erwartungsgemäß durch den Inhibitor nicht beeinflusst wurde. Dies zeigt, dass **7** möglicherweise die Zellwand passieren und DltA *in vivo* inhibieren kann. Somit wird auf Proteinebene eine ähnliche Situation geschaffen, wie sie in der Deletionsmutante vorliegt. Da Gram-negativen Stämmen dieser D-Alanylierungs-Stoffwechselweg fehlt, wurde erwartet, dass *E. coli* vom Inhibitor unbeeinflusst bleibt. Konzentrationen von **7**, die im Fall Gram-positiver Stämme den gewünschten Effekt erzeugten, ließen *E. coli* wie erwartet unbeeinflusst, allerdings kann aufgrund der Ergebnisse bei sehr hohen (10 μ M) Inhibitorkonzentrationen nicht ausgeschlossen werden, dass **7** auch andere Enzyme hemmt. Da das Gram negative Bakterium *Micrococcus luteus* von **7** nicht beeinflusst wird, kann eine Interaktion mit der tRNA Synthetase jedoch ausgeschlossen werden.

6.2.1.3 Ausblick

Die Inhibierung von DltA macht **7** zu einem vielversprechenden Kandidaten mit pharmakologischer Relevanz, dessen Wirkmechanismus jedoch noch genauer untersucht werden muss. Es kann daher spekuliert werden, dass auch andere Phänotypen auf diese Weise erzeugt werden können. Zum einen kann auf diese Weise die Effizienz von Antibiotika vergrößert werden, zum anderen könnte die Bildung bakterieller Biofilme unterbunden werden.

Bakterielle Biofilme werden gebildet, wenn einzelle Organismen sich zu einer Gemeinschaft vereinigen, die auf einer festen Oberfläche verankert ist (181,182). Die Bakterien können verschiedenen Spezies entstammen und sind in eine extrazelluläre Polysaccharidmatrix eingebettet. Diese Art des Wachstums scheint für die Infektion und Persistenz im menschlichen Körper wichtig zu sein und ist besonders mit medizinischen Geräten assoziiert. Bakterielle Zellen, die sich zu Biofilmen verbunden haben, sind gegenüber Antibiotika und kationischen Substanzen besonders resistent (181,182). Für einige Substanzen scheint dieser bakterielle Schleim eine physikalische oder chemische Diffusionsbarriere zu sein, allerdings ist die Ursache der Resistenzbildung bisher nicht bekannt. Untersuchungen, die zeigten, dass einige Antibiotika in den Biofilm eindringen können deuten auf andere Mechanismen der Abwehr hin. Das langsame Wachstum der Zellen in diesen Filmen könnte dazu beitragen. Außerdem haben diese Zellen einen besonderen Phänotyp. Dieser Phänotyp wird durch den generellen Stress in diesen Filmen (z.B. limitiertes Nährstoffangebot) induziert und trägt unter anderem durch die Expression von Genen für Antibiotikatransporter zur Resistenz bei. Die Ladung der Zellwand scheint für die Adhäsion der Zellen eine wichtige

Rolle zu spielen. Eine *Listeria monocytogenes* DltA⁻ Mutante war nicht mehr in der Lage in gleicher Weise wie der Wildtyp an andere Zellen zu binden (183). Diese Zellen waren dann dem Wirtsimmunsystem länger ausgesetzt, wodurch schnellere Abtötung der *Listerien* resultierte. Ein Inhibitor wie **7** könnte also einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung der Biofilmbildung leisten. Zumindest könnte auf diese Weise die Biofilmbildung genauer untersucht werden, da sich die D-Alanylierung der Zellwand durch den Inhibitor modulieren lässt. Im Gegensatz dazu konnte mit der *L. monocytogenes* DltA⁻ Mutante lediglich der Phänotyp des völligen Fehlens dieser D-Ala Modifikation untersucht werden.

Neben der Biofilmbildung leisten auch die Siderophore einen wichtigen Beitrag, die es dem Bakterium ermöglichen im Wirt zu überleben. Unter Wirtsbedingungen stehen Fe³⁺-Ionen nur in limitierter Menge zur Verfügung. Daher stellen die Siderophore wichtige Moleküle dar, die mit der hohen Virulenz von z.B. *P. aeruginosa* assoziiert sind (177). Neben der Möglichkeit, die für die Modifikation der entsprechenden NRPS zuständige PPTase zu inhibieren, wären auch die A-Domänen dieser Synthetasen gute Angriffspunkte. Da z.B. in der Bacillibactin NRPS eine Dihydroxybenzoat-aktivierende A-Domäne vorkommt, wäre durch den entsprechenden Inhibitor keine Kreuzreaktion mit den tRNA Synthetasen zu erwarten. Dies würde es dem Bakterium ermöglichen zu überleben, es wäre allerdings der Siderophore beraubt und pathogene Bakterien hätten einen Großteil ihrer Virulenz eingebüßt.

6.2.2 Linkermodifizierte Inhibitoren zur gerichteten Proteinevolution

Neben der Inhibierung ganzer Stoffwechselwege stellen die Inhibitoren auch vielversprechende Werkzeuge für andere Anwendungen dar. Zum einen können sie, wie im Fall der tRNA Synthetasen (118) zum Studium des Reaktionsmechanismus von A-Domänen eingesetzt werden, zum anderen aber auch zu ihrer Kristallisation dienen. Die Kristallisation von ganzen (A-PCP-C) NRPS Modulen steht bis zum heutigen Tag aus. Diese Inhibitoren könnten einen wertvollen Beitrag leisten, um die vermutlich sehr flexiblen Module in einem Zustand einzufrieren, der die Kristallisation zu ermöglicht.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich ATP-bindende Proteine aus einer Zufallsproteinsequenz-Bibliothek isolieren lassen (184). Die Zufallsbibliothek wurde durch ungerichtete Ligation verschiedener DNA-Kassetten gefolgt von *in vitro* Produktion der Proteine erzeugt. Nach mehreren Selektionsrunden an matrixgebundenem ATP wurde mutagene PCR eingesetzt, um den Sequenzraum noch zu vergrößern und Proteine mit besseren ATP-Bindungskonstanten zu erhalten. Diese Technik ließe sich zur gerichteten

Evolution von A-Domänen ausnutzen. Dazu ist einerseits ein matrixgebundenes Selektionsmolekül notwendig und außerdem eine Methode, um eine A-Domänenbibliothek zu erzeugen. Um der ersten Voraussetzung gerecht zu werden, wurden von Aventis R&T Inhibitoren mit flexiblen Polyether- und Polyether-Biotinlinkern synthetisiert. Obwohl LeuA von dem so modifizierten Molekül nicht mehr inhibiert wird, zeigt sowohl der linkermodifizierte **5**, als auch der Biotinlinker-modifizierte Inhibitor **6** mit PheA die gleichen inhibitorischen Eigenschaften, wie der unmodifizierte Inhibitor **1**. Inhibitor **6** kann an eine Streptavidin- oder Streptactinmatrix gebunden werden, da das Biotin eine starke Verbindung mit diesen Peptiden eingeht. Dieser matrixgebundene Inhibitor eignet sich zur Selektion einer A-Domäne mit bestimmter Eigenschaft: Im Falle von **6** also einer Phe-aktivierenden A-Domäne. A-Domänen mit dieser Eigenschaft könnten aus komplexen Mischungen gewonnen werden (Abb. 68).

Um A-Domänenbibliotheken herstellen zu können, wurde eine Methode für eine mutagene (*error prone*) PCR entwickelt (Abb. 68 A). In dieser Methode wird dITP eingesetzt. In den ersten Zyklen der PCR wird dITP in die neusynthetisierte DNA eingebaut. In weiteren PCR Zyklen kann dITP mit dATP, dCTP und dTTP basenpaaren, was zur Einführung von zufälligen Mutationen führt. Da eine solche Methode auf Amplifikate von bis zu 1 kb beschränkt ist, wurde für A-Domänen der für die aktive Tasche kodierende Bereich ausgewählt. Dazu standen Konstrukte zur Verfügung, welche es erlauben, den 240 bp großen Bereich, der für die 80 AS der aktiven Tasche kodiert (Core A4-A5), herauszuschneiden und durch andere Bereiche zu ersetzen. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass mit dieser Methode durchschnittlich 1.7 Mutationen pro Klon erhalten werden konnten. Aus gegenwärtiger Sicht kann nicht gesagt werden, ob diese Anzahl von Mutationen ausreicht, um die Selektivität einer A-Domäne zu verändern, noch gibt es gesicherte Erkenntnisse über die notwendige Anzahl von Mutationen, um eine Veränderung zu erreichen (185).

Im nächsten Schritt müssten A-Domänen *in vitro* produziert werden (Abb. 68 B). Dies stellt eine besondere Herausforderung dar, da nach erfolgreicher Selektion ein Zugriff auf die genetische Information notwendig ist. Die von mir unternommenen Versuche mit Hilfe eines *E. coli* Lysats waren bisher, vermutlich aufgrund des His₆-Tags, erfolglos. In vorangegangenen Untersuchungen konnte jedoch eine erfolgreiche *in vitro* Produktion von A-Domänen nachgewiesen werden (85). Außerdem wurde dort eine kovalente Verbindung von Protein und genetischer Information nach einer zuvor beschriebenen Methode (186) erreicht. Schließlich kann die so erzeugte A-Domänenbibliothek mit Hilfe des matrixgebundenen Inhibitors einer Selektion unterworfen werden (Abb. 68 C).

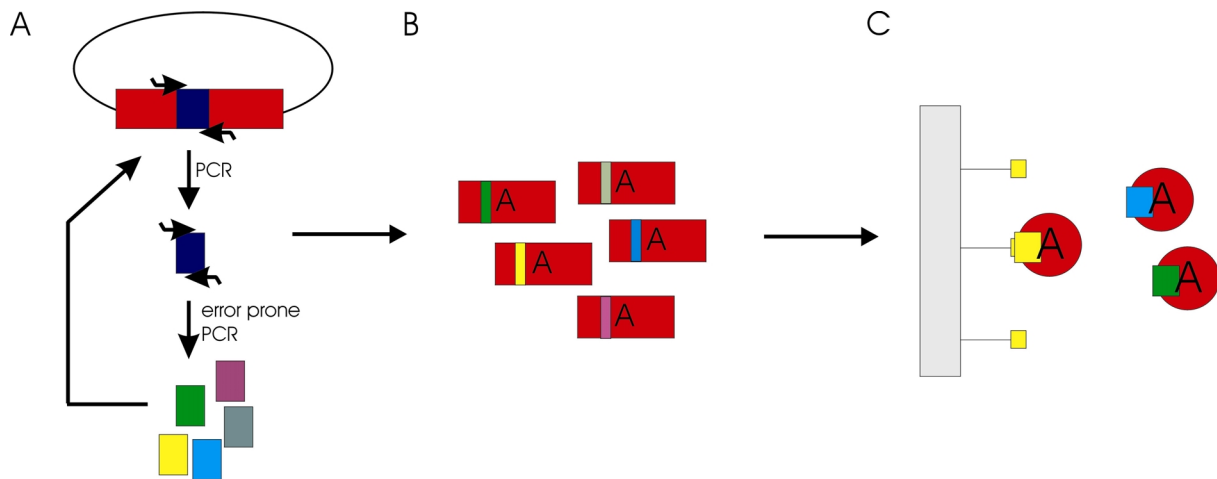


Abb. 68: Gerichtete Evolution von A-Domänen. **A.** Zunächst wird eine mutagene (*error prone*) PCR zum Einfügen zufälliger Mutationen in den für die aktive Tasche kodierenden Bereich der A-Domäne eingesetzt. **B.** Religation dieses Bereichs in den Vektor führt zu Erzeugung einer Bibliothek verschiedener Mutanten. **C.** Diese Mutanten müssen *in vitro* exprimiert werden und können anschließend selektiert werden. Demnach können nur die A-Domänen an den matrixgebundenen Inhibitor binden, die die gewünschte Eigenschaft besitzen, welche der Inhibitor vorgibt.

Der Einsatz verschiedener Aminoacyladenylat Analoga als Inhibitoren für diverse A-Domänen hat gezeigt, dass dieser Ansatz universellen Charakter hat. Daher ist es wahrscheinlich, dass geringe Veränderungen in der Synthese ausreichen, um Inhibitoren für beliebige A-Domänenselektivitäten zu erzeugen. Dies ermöglicht somit auch die Selektion auf beliebige A-Domänenselektivitäten.

6.2.3 Die Luciferase als Testsystem zur gerichteten Proteinevolution

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Erzeugung neuer A-Domänenselektivitäten ist die Herstellung der Bibliothek. Da die Evolution mit dem oben beschriebenen System eine aufwändige Methode darstellt, war mein Bestreben, ein möglichst einfaches Testsystem zur Feststellung der besten Mutageneserate für A-Domänen zu etablieren. Die Luciferase ist in verschiedener Hinsicht dafür ein geeigneter Kandidat. Zum einen katalysiert die Luciferase eine der A-Domäne ähnliche Reaktion, zum anderen besteht große strukturelle Ähnlichkeit zur A-Domäne (106,112). Daher sollte es möglich sein eine A-Domäne evolutiv so zu verändern, dass sie Luciferin als Substrat akzeptiert.

6.2.3.1 Charakterisierung der Luciferase aus *P. pyralis*

Die eukaryontische *P. pyralis* Luciferase lässt sich in *E. coli* in löslicher und aktiver Form produzieren. Diese Erfahrung deckt sich mit früheren Untersuchungen (187). *In vitro* konnte die Aktivität mit einem Luminometer und auch mit bloßem Auge beobachtet werden. Da es sich im Fall der Luciferase um sog. *glow*-Lumineszenz handelt, die bis zu 10 min konstant leuchtet, ist eine schnelle Messmethode nicht erforderlich.

Es kann zur Aktivitätsbestimmung der Luciferase auch gänzlich auf ein Messgerät verzichtet werden. Dazu wurde in Anlehnung an eine frühere Untersuchung (165) eine Methode entwickelt, nach der sich die Aktivität der Luciferase *in vivo* beobachten lässt. Das Substrat der Luciferase, das Luciferin, diffundiert bei sauerem pH in *E. coli* Zellen und erreicht dort die Luciferase. Das zweite Substrat, ATP, ist in den Zellen in ausreichender Menge vorhanden. Die Luciferase setzt nun Luciferin zu Luciferyl-AMP um, das von Luftsauerstoff unter Lichtabgabe oxidiert wird. Als Resultat lässt sich die Aktivität der Luciferase mit bloßem Auge in Form leuchtender Kolonien beobachten. Um ein permanentes Abbild dieser Aktivität zu erhalten, kann Film aufgelegt werden, der schon nach 2 min ausreichend belichtet ist.

6.2.3.2 Testsystem auf Veränderung der A-Domänenselektivität

Die Methode der leuchtenden Kolonien kann man sich zunutze machen, um auf eine Veränderung der A-Domänenselektivität in Richtung Luciferin zu prüfen. Am Anfang steht auch hier die Herstellung der A-Domänenbibliothek (Abb. 69 A und B). *E. coli* wird anschließend mit der Bibliothek transformiert und auf Membranen ausgestrichen. Nachdem Kolonien sichtbar sind, können die Membranen abgezogen und in Luciferinlösung gelegt werden. Solche Kolonien, die eine Luciferin-aktivierende A-Domäne produzieren, werden in Form leuchtender Kolonien sichtbar (Abb. 69 C).

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht in der Kopplung von Protein und genetischer Information. Auch nachdem die Membranen in Luciferinlösung gelegt wurden, wachsen die Bakterien auf frischem Medium wieder an und das in ihnen enthaltene Plasmid kann anschließend präpariert werden. Außerdem lassen sich auf diese Weise mehrere 1000 Kolonien pro Tag untersuchen. Somit ist diese Methode besonders gut geeignet, um als Testsystem für die Mutageneserate zu dienen.

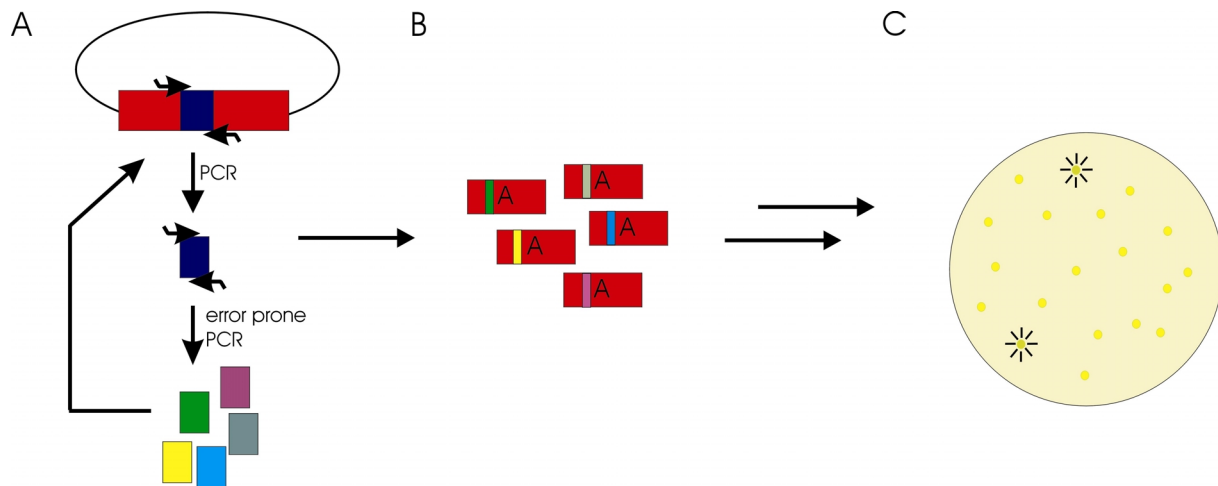


Abb. 69: Gerichtete Evolution von A-Domänen. **A.** Durch *error prone* PCR werden in das Gen einer A-Domäne zufällige Mutationen eingeführt. **B.** *E. coli* wird mit der daraus entstandene Bibliothek transformiert und auf Nitrocellulosemembranen ausgestrichen. **C.** Die Nitrocellulosemembranen werden nach Sichtbarwerden von Kolonien in Luciferinlösung gelegt. Eine Veränderung der A-Domänenselektivität in Richtung Luciferin wird durch leuchtende Kolonien angezeigt.

6.2.3.3 Ausblick

Bis jetzt konnte mit der unter 6.2.3.2 beschriebenen Methode keine A-Domäne isoliert werden, die in der Lage ist, Luciferin in ausreichender Menge zu aktivieren, so dass es durch das Auge allein detektierbar gewesen wäre. Daher wurde mit dem Auflegen von Film begonnen, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Bisher konnte allerdings auch mit dieser Verbesserung keine A-Domäne mit Selektivität für Luciferin gefunden werden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Beschränkung auf den Bereich zwischen CoreA4-A5 nicht ausreichend ist, um die Selektivität der A-Domäne zu verändern.

Frühere Anstrengungen, die Selektivität der A-Domäne zu verändern, stützten sich auf den Bereich zwischen Core A4-A5. Durch ortsgerichtete Mutagenese in diesem Bereich war es möglich, die Selektivität von SrfA-A1 von Glu zu Gln und die von SrfA-B2 von Asp zu Asn zu verändern (188). Dieser rationale Ansatz stützte sich auf die Erkenntnisse aus dem nichtribosomalen Code (32) über die selektivitätsbestimmenden AS der A-Domänen, konnte allerdings bisher nicht zeigen, dass sich auf diese Weise völlig neue Selektivitäten erzeugen lassen. Wäre der Bereich zwischen Core A4-A5 allein für die Selektivität einer A-Domäne verantwortlich, so müsste auch ein Austausch dieses Bereichs innerhalb zweier A-Domänen die gewünschte Veränderung der Selektivität mit sich bringen. Untersuchungen dazu zeigten allerdings, dass eine A-Domäne mit fremdem A4-A5 Bereich weitestgehend die ursprüngliche Selektivität beibehält (146). Obwohl die Nebenselektivität dieser A-Domänen vergrößert war, wurde die erwartete Aminosäure in keinem Fall aktiviert. Daher ist zu vermuten, dass die

Zufallsmutagenese des Bereichs, der für Core A4-A5 kodiert, nicht ausreichend ist, um A-Domänen mit neuen Selektivitäten zu erzeugen. Eine Möglichkeit bestünde darin, das A-Domänen Gen in drei Bereiche zu unterteilen und diese getrennt einer Zufallsmutagenese zu unterwerfen. Der Sequenzraum könnte weiter vergrößert werden, wenn diese einzelnen „DNA-Kassetten“ danach zufällig zusammengesetzt werden, ähnlich dem oben beschriebenen System von Keefe *et al.* (184).

Obwohl die A-Domänen der NRPS maßgeblich die Primärsequenz des Produkts bestimmen, bleibt abzuwarten, ob die Veränderung ihrer Spezifität tatsächlich zu neuen NRPS Produkten führt. Neben der A-Domäne hat auch die C-Domäne eine gewisse Substratselektivität (41). C-Domänen scheinen eine Akzeptorstelle für das Aminoacyl-S-4'PP Nukleophil zu besitzen, die zwischen Enantiomeren und Veränderungen in der AS-Seitenkette unterscheiden kann. Im Gegensatz dazu wurde für die Donorstelle des Elektrophils der C-Domäne praktisch keine Selektivität festgestellt. Da fast alle Elongationsmodule eine C-Domäne besitzen, könnten Veränderungen in der Selektivität der zugehörigen A-Domäne eine Erniedrigung der Wechselzahl der NRPS bewirken. Im äußersten Fall kann dies auch zur Stagnation der Synthese führen. Möglicherweise ist es notwendig, A-C-Einheiten oder sogar Module als Gesamtheit (obwohl eine Selektivität von PCP bisher nicht nachgewiesen ist) evolutiv zu verändern, um der C-Domänen Selektivität Rechnung zu tragen.

7. Literatur

1. Stryer, L. (1995) *Biochemie*, vierte Auflage Ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
2. Marini, P., Li, S.-J., Gardiol, D., Cronan, J. E. J., and de Mendoza, D. (1995). The genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase subunits of *Bacillus subtilis* acetyl coenzyme A carboxylase of fatty acid synthesis. *J Bacteriol* **177**(23), 7003-7006.
3. Alberts, A., and Vagelos, P. R. (1972) in *The enzymes*, pp. 37-82, N.Y.: Academic Press
4. Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J., and Lane, M. D. (1974). Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. Purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase, and carboxyl carrier protein components. *J Biol Chem* **249**(20), 6633-6645.
5. Harder, M., Ladenson, R. C., Schimmel, S. D., and Silbert, D. F. (1974). Mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *J Biol Chem* **249**(23), 7468-7475.
6. D'Angnolo, G., Rosenfeld, I. S., Awaya, J., Omura, S., and Vagelos, P. R. (1973). Inhibition of fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin, specific inactivation of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase. *Biochim Biophys Acta* **326**(2), 155-156.
7. D'Angnolo, G., Rosenfeld, I. S., and Vagelos, P. R. (1975). Multiple forms of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250**(14), 5289-5294.
8. Garwin, J. L., Klages, A. L., and Cronan, J. E. J. (1980). Structural, enzymatic, and genetic studies of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I and II of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **255**(24), 11949-11956.
9. Marrakchi, H., Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2002). Mechanistic diversity and regulation of type II fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans* **30**(6), 1050-1055.
10. Rock, C. O., and Cronan, J. E. (1996). *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1302**, 1-16.
11. Black, P. N., and DiRusso, C. C. (1994). Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1210**, 123-145.

12. Joshi, A. K., Rangan, V. S., Witkowski, A., and Smith, S. (2003). Engineering of an active animal fatty acid synthase dimer with only one competent subunit. *Chem Biol* **10**, 169-173.
13. Rangan, V. S., Joshi, A. K., and Smith, S. (2001). Mapping of the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. *Biochemistry* **40**, 10792-10799.
14. Rangan, V. S., and Smith, S. (1997). Alteration of the substrate specificity of the malonyl-CoA/acetyl-CoA:acyl carrier protein S-acyltransferase domain of the multifunctional fatty acid synthase by mutation of a single arginine residue. *J Biol Chem* **272**(18), 11975-11978.
15. Fichtlscherer, F., Wellein, C., Mittag, M., and Schweizer, E. (2000). A novel function of yeast fatty acid synthase - Subunit alpha is capable of self-pantetheinylation. *Eur J Biochem* **267**, 2666-2671.
16. Hopwood, D. A. (1997). Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev* **97**, 2465-2497.
17. Cane, D. E., and Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**(12), R319-325.
18. Katz, L. (1997). Manipulation of Modular Polyketide Synthases. *Chem Rev* **97**(7), 2557-2576.
19. Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **20**, 275-287.
20. Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (eds) (2002) *Nonribosomal Assembly of Peptide Antibiotics on Modular Protein Templates*, A. L. Sonenshein Ed. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Genes to Cells*, ASM Press, Washington D.C.
21. Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., and Mootz, H. D. (1997). Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* **97**(7), 2651-2674.
22. van Wageningen, A., Kirkpatrick, P., Williams, D., Harris, B., Kershaw, J., Lennard, N., Jones, M., Jones, S., and Solenberg, P. (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol* **5**, 155-162.
23. Quadri, L. E., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P., and Walsh, C. T. (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for

- peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**(6), 1585-1595.
24. Crosa, J. H., and Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(2), 223-249.
 25. May, J. J., Wendrich, T. M., and Marahiel, M. A. (2001). The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* **276**(10), 7209-7217.
 26. Patel, H. M., and Walsh, C. T. (2001). In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry* **40**(30), 9023-9031.
 27. Cox, C. D., and Graham, R. (1979). Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **137**, 357-364.
 28. Cox, C. D., and Adams, P. (1985). Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **48**, 130-138.
 29. Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbard, B. K., Losey, H. C., Luo, L., Marshall, C. G., Miller, D. A., and Patel, H. M. (2001). Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **5**(5), 525-534.
 30. Schwarzer, D., and Marahiel, M. A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**(3), 93-101.
 31. Stachelhaus, T., and Marahiel, M. A. (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett* **125**(1), 3-14.
 32. Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**(8), 493-505.
 33. Marahiel, M. A. (1997). Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem Biol* **4**(8), 561-567.
 34. Stachelhaus, T., and Marahiel, M. A. (1995). Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem* **270**(11), 6163-6169.

35. Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M. A., and Holak, T. A. (2000). Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold Des* **8**(4), 407-418.
36. Stachelhaus, T., Hüser, A., and Marahiel, M. A. (1996). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* **3**(11), 913-921.
37. Roche, E. D., and Walsh, C. T. (2003). Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptides synthesis. *Biochemistry* **42**, 1334-1344.
38. Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T., and Keating, A. E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **9**(7), 522-526.
39. Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V., and Marahiel, M. A. (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **273**(35), 22773-22781.
40. Linne, U., and Marahiel, M. A. (2000). Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry* **39**(34), 10439-10447.
41. Belshaw, P. J., Walsh, C. T., and Stachelhaus, T. (1999). Aminoacyl-CoAs as Probes of Condensation Domain Selectivity in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Science* **284**, 486-489.
42. Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., and Morris, H. R. (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* **271**(26), 15428-15435.
43. Schwarzer, D., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (2001). Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem Biol* **8**(10), 997-1010.
44. Schneider, A., and Marahiel, M. A. (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **169**(5), 404-410.
45. Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E., and Leitner, E. (1994). The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet* **26**(2), 120-125.

46. Linne, U., Doekel, S., and Marahiel, M. A. (2001). Portability of Epimerization Domain and Role of Peptidyl Carrier Protein on Epimerization Activity in Nonribosomal Peptide Synthetases [In Process Citation]. *Biochemistry* **40**, 15824-15834.
47. Stachelhaus, T., and Walsh, C. T. (2000). Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* **39**(19), 5775-5787.
48. Luo, L., Kohli, R. M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M. A., and Walsh, C. T. (2002). Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry* **41**(29), 9184-9196.
49. Marshall, C. G., Hillson, N. J., and Walsh, C. T. (2002). Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry* **41**(1), 244-250.
50. Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K., and Marahiel, M. A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol* **4**(12), 927-937.
51. Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M., and Zocher, R. (1993). Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol Microbiol* **7**(6), 905-914.
52. Haese, A., Pieper, R., von Ostrowski, T., and Zocher, R. (1994). Bacterial expression of catalytically active fragments of the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *J Mol Biol* **243**(1), 116-122.
53. Burmester, J., Haese, A., and Zocher, R. (1995). Highly conserved N-methyltransferases as an integral part of peptide synthetases. *Biochem Mol Biol Int* **37**(2), 201-207.
54. Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N., and Keller, U. (2000). Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol* **7**(4), 287-297.
55. Mootz, H. D., Schörgendorfer, K., and Marahiel, M. A. (2002). Functional characterization of 4'-phosphopantetheinyl transferase genes of bacterial and fungal origin by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* lys5. *FEMS Microbiol Lett* **213**(1), 51-57.

56. Ehmann, D. E., Gehring, A. M., and Walsh, C. T. (1999). Lysine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoacidopate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* **38**, 6171-6177.
57. Kasahara, T., and Tadafumi, K. (2003). A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature* **422**, 832.
58. Richardt, A., Kemme, T., Wagner, S., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., and Hovemann, B. T. (2003). Ebony: a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J Biol Chem* **in Press**
59. Geurts, R., and Bisseling, T. (2002). Rhizobium Nod factor perception and signaling. *Plant Cell* **14**, 239-249.
60. Ritsema, T., Geiger, O., van Dillewijn, P., Lugtenberg, B. J. J., and Spaink, H. P. (1994). Serine residue 45 of nodulation protein NodF from *Rhizobium eguminosarum* bv. *viciae* is essential for its biological function. *J Bacteriol* **176**, 7740-7743.
61. Geiger, O., and López-Lara, I. M. (2002). Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell-surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS microbiol lett* **208**, 153-162.
62. Xu, G. Y., Tam, A., Lin, L., Hixon, J., Fritz, C. C., and Powers, R. (2001). Solution structure of *B. subtilis* acyl carrier protein. *Structure (Camb)* **9**(4), 277-287.
63. von Döhren, H., Dieckmann, R., and Pavela-Vrancic, M. (1999). The nonribosomal code. *Chem Biol* **6**, 273-279.
64. Wong, H. C., Liu, G., Zhang, Y.-M., Rock, C. O., and Zheng, J. (2002). The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **277**(18), 15874-15880.
65. Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**(11), 923-936.
66. Walsh, C. T., Gehring, A. M., Weinreb, P. H., Luis, E. N., and Flugel, R. S. (1997). Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthetases. *Curr Op Chem Biol* **1**, 309-315.
67. Peypoux, F., Bonmatin, J. M., and Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(5), 553-563.

68. Nakano, M. M., Corbell, N., Besson, J., and Zuber, P. (1992). Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **232**(2), 313-321.
69. Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M. (1999). The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(9), 2183-2192.
70. Flugel, R. S., Hwangbo, Y., Lambalot, R. H., Cronan, J. E., Jr., and Walsh, C. T. (2000). Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(2), 959-968.
71. Lambalot, R. H., and Walsh, C. T. (1997). Holo-[acyl-carrier-protein] synthase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **279**, 254-262.
72. Lambalot, R. H., and Walsh, C. T. (1995). Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase. *J Biol Chem* **270**(42), 24658-24661.
73. Polacco, M. L., and Cronan, J. E., Jr. (1981). A mutant of *Escherichia coli* conditionally defective in the synthesis of holo-[acyl carrier protein]. *J Biol Chem* **256**(11), 5750-5754.
74. Gehring, A. M., Lambalot, R. H., Vogel, K. W., Drueckhammer, D. G., and Walsh, C. T. (1997). Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates in vitro for *E. coli* holo-ACP synthase. *Chem Biol* **4**(1), 17-24.
75. Debabov, D. V., Heaton, M. P., Zhang, Q., Stewart, K. D., Lambalot, R. H., and Neuhaus, F. C. (1996). The D-Alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *J Bacteriol* **178**(13), 3869-3876.
76. Stuible, H.-P., Meier, S., Wagner, C., Hannappel, W., and Schweizer, E. (1996). A novel phosphopantetheine:protein transferase activating yeast mitochondrial acyl carrier protein. *J Biol Chem* **273**(35), 22334-22339.
77. Takiff, H. E., Baker, T., Copeland, T., Chen, S. M., and Court, D. L. (1992). Locating essential *Escherichia coli* genes by using mini-Tn10 transposons: the *pdxJ* operon. *J Bacteriol* **174**(5), 1544-1553.
78. Parris, K. D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C. C., Seehra, J., and Somers, W. S. (2000). Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure Fold Des* **8**(8), 883-895.

79. Chirgadze, N. Y., Briggs, S. L., McAllister, K. A., Fischl, A. S., and Zhao, G. (2000). Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* acyl carrier protein synthase: an essential enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis. *Embo J* **19**(20), 5281-5287.
80. McAllister, K. A., Peery, R. B., Meier, T. I., Fischl, A. S., and Zhao, G. (2000). Biochemical and molecular analyses of the *Streptococcus pneumoniae* acyl carrier protein synthase, an enzyme essential for fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem* **275**(40), 30864-30872.
81. Reuter, K., Mofid, M. R., Marahiel, M. A., and Ficner, R. (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J* **18**, 6823-6831.
82. Mofid, M. R., Marahiel, M. A., Ficner, R., and Reuter, K. (1999). Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(5), 1098-1100.
83. Mofid, M. R. (2003) *Posttranslationale Modifikation von nichtribosomalen Peptidsynthetasen durch die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp: Biochemische Analyse, Substraterkennung und Modell zum Reaktionsmechanismus*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg
84. Gocht, M., and Marahiel, M. A. (1994). Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* **176**(9), 2654-2662.
85. Neumüller, A. (2001) *Untersuchungen zur Bacitracin Selbst-Resistenz in Bacillus licheniformis ATCC 10716 und Grundlagen zur gerichteten Protein-Evolution von Adenylierungsdomänen aus Peptidsynthetasen*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg
86. Wyckoff, E. E., Stoebner, J. A., Reed, K. E., and Payne, S. M. (1997). Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol* **179**(22), 7055-7062.
87. Silakowski, B., Schairer, H. U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S., and Muller, R. (1999). New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem* **274**(52), 37391-37399.
88. Keszenman-Pereyra, D., Lawrence, S., Twfieg, M. E., Price, J., and Turner, G. (2003). The *npgA/cfwA* gene encodes a putative 4'-phosphopantetheinyl transferase which is

- essential for penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **43**(3), 186-190.
89. Joshi, A. K., Zhang, L., Rangan, V. S., and Smith, S. (2003). Cloning, expression and characterization of a human 4'-phosphopantetheinyl transferase with broad substrate specificity. *J Biol Chem* **278**(35), 33142-33149.
90. Praphanphoj, V., Sacksteder, K. A., Gould, S. J., Thomas, G. H., and Geraghty, M. T. (2001). Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase phosphopantetheinyl transferase gene, the human ortholog of the yeast *Lys5* gene. *Mol Gen Met* **72**, 336-342.
91. Stuible, H. P., Meier, S., and Schweizer, E. (1997). Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine:protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur J Biochem* **248**(2), 481-487.
92. Finking, R. (2000) *Biochemische Charakterisierung der Acyl Carrier Protein Synthase aus der Fettsäuresynthese von Bacillus subtilis*, Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg
93. Gehring, A. M., Bradley, K. A., and Walsh, C. T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **36**, 8495-8503.
94. Mootz, H. D., Finking, R., and Marahiel, M. A. (2001). 4'-Phosphopantetheine Transfer in Primary and Secondary Metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **276**(40), 37289-37298.
95. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
96. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
97. Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U., and Marahiel, M. A. (2002). Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22), 14083-14088.
98. Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* **293**, 321-331.

99. Weiss, M. A., Ellenberger, T., Wobbe, C. R., Lee, J. P., Harrison, S. C., and Struhl, K. (1990). Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* **347**, 575-578.
100. Zhang, Y. M., Rao, M. S., Heath, R. J., Price, A. C., Olson, A. J., Rock, C. O., and White, S. W. (2001). Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on beta-ketoacyl-ACP synthase III. *J Biol Chem* **276**(11), 8231-8238.
101. Worsham, L. M. S., Earls, L., Jolly, c., Langston, K. G., Trent, M. S., and Ernst-Fronberg, M. L. (2003). Amino acid residues of *Escherichia coli* acyl carrier protein involved in heterologous protein interactions. *Biochemistry* **42**, 167-176.
102. Flaman, A. S., Chen, J. M., Van Iderstine, S. C., and Byers, D. M. (2001). Site-directed mutagenesis of Acyl carrier protein reveals amino acid residues involved in ACP structure and Acyl-ACP synthetase activity. *J Biol Chem* **276**(38), 35934-35939.
103. Andrec, M., Hill, R. B., and Prestgard, J. H. (1995). Amide exchange rates in *Escherichia coli* acyl carrier protein: correlation with protein structure and dynamics. *Protein Sci* **4**(5), 983-993.
104. Dieckmann, R., Lee, Y. O., van Liempt, H., von Döhren, H., and Kleinkauf, H. (1995). Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett* **357**(2), 212-216.
105. Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**(21), 6843-6850.
106. Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A., and Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non- ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* **16**(14), 4174-4183.
107. May, J. J., Keßler, N., Marahiel, M. A., and Stubbs, M. T. (2002). Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19), 12120-12125.
108. Turgay, K., Krause, M., and Marahiel, M. A. (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol* **6**(4), 529-546.
109. Arnez, J. G., and Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci* **22**(6), 203-206.

110. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**(6289), 203-206.
111. Weber, T., and Marahiel, M. A. (2001). Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure (Camb)* **9**(1), 3-9.
112. Conti, E., Franks, N. P., and Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**(3), 287-298.
113. Franks, N. P., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W. R., and Brick, P. (1998). Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophys J* **75**(5), 2205-2211.
114. Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop -- a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**(11), 430-434.
115. Forrest, A. K., Jarvest, R. L., Mensah, L. M., O'Hanlon, P. J., Pope, A. J., and Sheppard, R. J. (2000). Aminoalkyl Adenylate and Aminoacyl Sulfamate Intermediate Analogues Differing Greatly in Affinity for their Cognate *Staphylococcus aureus* tRNA Synthetases. *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 1871-1874.
116. Pope, A. J., Moore, K. J., McVey, M., Mensah, L., Benson, N., Osbourne, N., Broom, N., Brown, M. J. B., and O'Hanlon, P. (1998). Characterization of Isoleucyl-t-RNA Synthetase from *Staphylococcus aureus*
II. Mechanism of inhibition by reaction intermediate and pseudomonic acid analogues studied using transient and steady-state kinetics. *J Biol Chem* **273**(48), 31691-31701.
117. Pope, A. J., Lapointe, J., Mensah, L., Benson, N., Brown, M. J. B., and Moore, K. J. (1998). Characterization of Isoleucyl-t-RNA Synthetase from *Staphylococcus aureus*
I: Kinetic mechanism of the substrate activation reaction studied by transient and steady-state techniques. *J Biol Chem* **273**(48), 31680-31690.
118. Cusack, S., Yaremchuk, A., and Tukalo, M. (1996). The crystal structures of *T. thermophilus* lysyl-tRNA synthetase complexed with *E. coli* tRNA(Lys) and a *T. thermophilus* tRNA(Lys) transcript: anticodon recognition and conformational changes upon binding of a lysyl-adenylate analogue. *EMBO J* **15**(22), 6321-6234.
119. Ueda, H., Yoshimitsu, S., Hayashi, N., Mitsunaga, J., In, Y., Doi, M., Inoue, M., and Ishida, T. (1991). X-ray crystallographic study of 5'-O[N-(L-alanyl)-sulfamoyl]adenosine, a substrate analogue for alanyl-tRNA synthetase. *Biochim Biophys Acta* **1080**, 126-134.

120. Isono, K., Uramoto, M., Kusakabe, H., Miyata, N., Koyama, T., Ubukata, M., Sethi, S. K., and McCloskey, J. A. (1984). Ascamycin and dealanylascamycin, nucleoside antibiotics from *Streptomyces* spp. *J Antibiot* **37**, 670-672.
121. Hahn, H., Falke, D., and Kaufmann, S. H. E. (2001) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 4., korrigierte Aufl. (Ullmann, U., Ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
122. Hyryläinen, H.-L., Vitikainen, M., Thwaite, J., Wu, H., Sarvas, M., Harwood, C. R., Kontinen, V. P., and Stephenson, K. (2000). D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **275**(35), 26696-26703.
123. Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M. A., Leopold, K., and Fischer, W. (1995). Incorporation of D-Alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**(26), 15598-15606.
124. Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., and Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**(13), 8405-8410.
125. Neuhaus, F. C., Heaton, M. P., Debatov, D. V., and Zhang, Q. (1996). The *dlt* operon in the biosynthesis of D-Alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*. *Microb Drug Resist* **2**(1), 77-84.
126. Kiriukhin, M. Y., and Neuhaus, F. C. (2001). D-alanylation of lipoteichoic acid: role of the D-alanyl carrier protein in acylation. *J Bacteriol* **183**(6), 2051-2058.
127. Debatov, D. V., Kiriukhin, Y., and Neuhaus, F. C. (2000). Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: role of DltD in D-Alanylation. *J Bacteriol* **182**(10), 2855-2864.
128. Peschel, A., Vuong, C., Otto, M., and Götz, F. (2000). The D-Alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(10), 2845-2847.
129. Wecke, J., Madela, K., and Fischer, W. (1997). The absence of D-Alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**, 2953-2960.
130. Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.

131. Zamenhof, P. J., and Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J Bacteriol* **110**, 171-178.
132. Grodberg, J., and Dunn, J. J. (1988). *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**(3), 1245-1253.
133. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol* **185**, 60-89.
134. Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., and Häuptle, M. T. D., B. (1987). A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Meth Enzymol* **155**, 416-433.
135. Stüber, D., Matile, H., and Garotta, G. (1990) in *Immunological Methods* (Levkovits, I., and Pernis, B., eds), pp. 121-152
136. Scutcliffe, J. G. (1979). Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Meth Enzymol* **43**, 77-90.
137. Miller, J. H. (1992) *A short course in bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
138. Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R., and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J Mol Biol* **257**, 753-766.
139. Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
140. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
141. Nakano, M. M., Marahiel, M. A., and Zuber, P. (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**(12), 5662-5668.
142. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J. S., M. H. , Hancock, R. E., Lory, S., and Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**(6799), 947-948.

143. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., and Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene (Amst)* **212**, 77-86.
144. Schweizer, H. P., and Hoang, T. T. (1995). An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **158**, 15-22.
145. Watson, A. A., Alm, R. A., and Mattick, J. S. (1996). Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **172**(1), 163-164.
146. Hammel, M. (2002) *Proteinevolution: Änderung der Substratspezifität von Adenylierungs-(A)-Domänen der nichtribosomalen Proteinbiosynthese (NRPS)*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Marburg
147. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
148. Wagner, E. G. H., and Flärdh, K. (2002). Antisense RNAs everywhere? *Trends Genet* **18**(5), 223-226.
149. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
150. Voinnet, O. (2002). RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 444-451.
151. Tabara, H., Sarkissioan, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-132.
152. Ketting, R., Haverkamp, T., van Leunen, H., and Plasterk, R. (1999). *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**, 133-141.
153. Jensen, S., Gassama, M. P., and Heidmann, T. (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet* **21**, 209-212.
154. Wu-Scharf, D., Jeong, B.-R., Zhang, C., and Cerutti, H. (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* **290**, 1159-1162.
155. Feinbaum, R., and Abros, V. (1999). The timing of *lin-4* RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **210**, 87-95.

156. Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**, 671-680.
157. Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z., and Ambros, V. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* **5**, 659-669.
158. Altuvia, S., and Wagner, E. G. H. (2000). Switching on and off with RNA. *Proc Nat Acad Sci USA* **97**(18), 9824-9826.
159. Kamath, R. S., Graser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P., and Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-237.
160. Tuschl, T. (2003). RNA sets the standard. *Nature* **421**, 220-221.
161. Tchurikov, N. A., Chistyakova, L. G., Zavilgelsky, G. B., Manukhov, I. V., Chernov, B. K., and Golova, Y. B. (2000). Gene-specific silencing by expression of parallel complementary RNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(34), 26523-26529.
162. Pelicic, V., Reyrat, J.-M., and Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* Gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**(4), 1197-1199.
163. DeLuca, M. (1976). Firefly luciferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Bio* **44**, 37-68.
164. Viviani, V. R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationship of insect luciferases. *Cell Mol Life Sci* **59**(11), 1833-1850.
165. Wood, K. V., and DeLuca, M. (1987). Photographic detection of luminescence in *Escherichia coli* containing the gene for firefly luciferase. *Analyt Biochem* **161**, 501-507.
166. Keating, D. H., Carey, M. R., and Cronan, J. E., Jr. (1995). The unmodified (apo) form of *Escherichia coli* acyl carrier protein is a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem* **270**(38), 22229-22235.
167. Crump, M. P., Crosby, J., Dempsey, C. E., Parkinson, J. A., Murray, M., Hopwood, D. A., and Simpson, T. J. (1997). Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry* **36**(20), 6000-6008.
168. Mofid, M. R., Finking, R., and Marahiel, M. A. (2002). Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by

- the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem* **277**(19), 17023-17031.
169. Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**, 279-313.
170. Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Camara, M., Haas, D., and Williams, P. (2001). The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and *N*-Acylhomoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**(22), 6676-6683.
171. Köhler, T., and Pechère, J. C. (2001). In vitro selection of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **7**, 7-10.
172. Cox, C. D. (1985). Iron transport and serum resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* **36**, 1-12.
173. Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schäfer, A., Jahn, D., and Marahiel, M. A. (2002). Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **277**(52), 50293-50302.
174. Li, B., and Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* **7**, 957-963.
175. Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-1696.
176. Finking, R., Neumüller, A., Solsbacher, J., Konz, D., Kretzschmar, G., Schweitzer, M., Krumm, T., and Marahiel, M. A. (2003). Amino acyl-adenylate substrate analogues for the inhibition of adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **4**, 903-906.
177. Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000). Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* Gene for High-Affinity Iron Acquisition and Infection. *Infect Immun* **68**(4), 1834-1839.
178. Doolittle, W. F. (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* **284**, 2124-2128.
179. Crump, M. P., Crosby, J., Dempsey, C. E., Murray, M., Hopwood, D. A., and Simpson, T. J. (1996). Conserved secondary structure in the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and the fatty acid synthase acyl carrier protein from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **391**(3), 302-306.

180. Wecke, J. P., M. Fischer, W. (1996). D-alanine deprivation of *Bacillus subtilis* teichoic acids is without effect on cell growth and morphology but affects the autolytic activity. *Microb Drug Resist* **2**(1), 123-129.
181. Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., and Roques, C. (2002). Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemotherapy* **46**(5), 1469-1474.
182. Thien-Fah, C. M., and O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**(1), 34-39.
183. Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., and Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**(1), 1-14.
184. Keefe, A. D., and Szostak, J. W. (2001). Functional proteins from a random-sequence library. *Nature* **410**, 715-718.
185. Brakmann, S., and Johnsson, K. (2002) *Directed molecular evolution of proteins*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
186. Roberts, R. W., and Szostak, J. W. (1997). RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12297-12302.
187. de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R., and DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23), 7870-7873.
188. Eppelmann, K., Stachelhaus, T., and Marahiel, M. A. (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**(30), 9718-9726.

8. Anhang

8.1 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst.

Tabelle 21: Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Lfd Nr	Name	Sequenz 5'-3'	Bemerkung
1	acpA-NcoI-5'	aat <u>tcc</u> atg gca aca tta gag cgt	Ampl. Von <i>acpA</i> aus gDNA von <i>B. subtilis</i>
2	acpA-BamHI-3'	ttt <u>tgg</u> atc ctt gct ggt ttt gla tgt agt tca	s. 1 f. pQE70[<i>acpS</i>] aus gDNA von <i>B. subtilis</i>
3	acpS-5'-EcoRV	tat <u>aga</u> att cgt acg caa agg agg tt	s. 3
4	acpS-3'-EcoRV	ata <u>aga</u> tct gct tga caa cct ttc aat	f. pΔ <i>acpA</i>
5	acpA-5'-SK	ata <u>atc</u> gat gag gaa agc att aac aag ct	s. 5
6	acpA-3'-SK	ata <u>gga</u> tcc ctggct ttt gaa atc cat ca	f. pdk67[<i>acpS</i>]
7	acpA-5'-pX	tat <u>act</u> agt agg agg tga att gct atg gc	s. 7 inverse PCR mit pΔ <i>acpA</i> zum einfügen der Kan-Kassette
8	acpA-3'-pX	ata <u>gga</u> tcc ttc ggc ggc act ttt agc a	s. 9
9	acpA-5'-IP	ata <u>aga</u> tct gct gat gct aaa agt ccc gc	f. pQE60[<i>dhc</i>]
10	acpA-3'-IP	ata <u>ctg</u> cag gca att cac ctc ccc tca ag	s. 11
11	5'-DCP B.s.	ata <u>cca</u> tgg att tta aac aag agg	Helixtausch in pQE70[<i>hycC3PCP</i>]
12	3'-DCP B.s.	ata <u>aga</u> tct ttt caa ctc aga cag ct	s. 13
13	5'-hybrid PCP	ata <u>gag</u> ctc gtt atg gaa ctt gaa gac/ gag tat cag gtt gag ctt cc	
14	3'-hybrid PCP	ata <u>gag</u> ctc aac tac atc tag gga atc/ tcc gcc gat ctg gaa aa	

15	5'-PA1165	ata <u>gc/a tgc</u> gcg cca tga acg acc gtc tc
16	3'-PA1165	ata <u>agg a tct/</u> ggc gcc gac cgc cac cag
17	Fi-3' amy back	cgt tgg ttg tat ccg tgt c
18	Fi-5' amy back	gct gtt tca ttg ggt tct gg
19	RF019(ClaI)	ata <u>atc gat/</u> gcgga aaa tca tcg tag atc gc
20	RF020(PstI)	ata <u>ctg cag/</u> atc agc acc taa gtc ttc c
21	RF020(SpeI)	ata <u>act agt/</u> gca gac aca tta gag cgt
22	RF022(BamHI)	ata <u>ggga tcc tct/</u> ttg ctg gtt ttg tat gta gtt
23	RF023(ClaI)	tat <u>tat/ cga tt</u> cga att acg cct t
24	RF024(SacI)	tat <u>tga gct/ cat</u> gca cga cgt gag ct
25	RF025	gcc gta tac agg cac aac g
26	RF026	gct ttg ctg att cag aat ata aac ac
27	RF027	ccg gaa agc caa agg gcaa
28	RF028	ata <u>gca tgc/</u> gca cca tcg aag aac gcg
29	RF029	ata <u>agg a tct/</u> ttg ctg gtg agc aac gat g
30	RF030	ata <u>gca tgc/</u> atc gag cgc ccg gta gc
31	RF031	ata <u>agg a tct/</u> caa tcc ctg ggc gaa cg
32	RF032	ata <u>tgc atg c/at</u> ctg ccc ccc gat tcc cgg
33	RF033	ata <u>agg a tct/</u> gtc cgc gca ggc cag ca

f. pQE70[<i>PA1165</i>]
s. 15
Amy-site Sequenzierprimer
s. 18
f. pΔ <i>acpA</i> 2
s. 20
f. pX[<i>acpA</i>]/ pMW6[<i>acpA</i>]
s. 21
Ampl von core A4-A5 von LeuA zur Randommutagenese (5')
s. 23 (3')
5'-Sequenzierprimer LeuA A4-A5
3'-Sequenzierprimer LeuA A4-A5
5'-Sequenzierprimer LeuA A4-A5
Klonierung von <i>acpP</i> aus <i>P. aeruginosa</i>
s. 28
Klonierung von pQE70[<i>pyvDI-PCP</i>]
s. 30
f. pQE70[<i>pchEArCP</i>]
s. 32

34 RF034 ata taa gct /at gcg cgc cat gaa cga cc
35 RF035 ata agg tct / tca ggc gcc gac cgc ca
36 RF036 ata atc gat / tat acg atg ccg cgc ttc
37 RF037 ata gga tcc / tca gcg ccc tgt ttc aga
38 RF038 ata ctg cag / cct ccg tct gca aaa gat
39 RF039 ata aga tct / ttt tca gtg cgtc ctg cat
40 RF040 ata agg tct / gat gca tgc cgc ctg ttc c
41 RF041 ata cca tgg / atc gag cgc ccg gta gc
42 RF042 ata cca tg/g gcg agt gtc gtc acg ag
43 RF043 ata agg tct / ggt ctg cac ctg caa gtg g
44 RF044 ata act agt / atg cgc gcc atg aac gac c
45 RF045 ata gga tcc / tca ggc gcc gac cgc ca
46 RF046 ata gga tcc / ggc gag tgt cgt cac gag
47 RF047 ata aag ctt / ggt ctg cac ctg caa gtg g
48 RF048 agc atg tcg aac tgg tac tg
49 RF049 gca ttt acc tgg ctg caa tg
50 RF050 ata gca tgc / att tac ggc att ggg ctg g
51 RF051 ata aag ctt / gct tga caa cct ttc aat cac a
52 5'-pQE_promotor ccc gaa aag tgc cac ctg
53 5'-pQE_type III/IV cgg ata aca att tca cac ag
54 3'-pQE_reverse ggt cat tac tgg agt ctt g

f. pDR67[*P_{AI165}*]
s. 34
pΔ*sfp*
s. 36
Inverse PCR mit pΔ*sfp*
s. 38
f. pQE60[*pvdD2PCP*]
s. 40
f. pQE60[*pchePCP*]
s. 42
f. pMW6[*P_{AI165}*], pX[*P_{AI165}*]
s. 44
f. pQE30[*pchePCP*]
s. 46
Ampl. der amyE-site (5')
s. 48
f. pQE30[*acpS*]
s. 50
forward Sequenzierprimer pQE-
Vektoren (inkl. Promotor)
forward Sequenzierprimer pQE-
Vektoren (exkl. Promotor)
reverse Sequenzierprimer pQE-
Vektoren

55	RF055	ata <u>gaa ttc</u> / ggt tga gcc cga tct tgc	f. pEX18Ap[5'- <i>pcpS</i> -3']
56	RF056	ata <u>aag ctt</u> / ctt tgc ctg gcc gaa tgg	s. 55
57	RF057	gac caa tac tat gag ctt tca gag gat cga aaa aac gaa ttt ctc gcg gg	f. pTz18R[<i>acpS</i>]K44D
58	RF058	ccc gcg aga aat tgc ttt ttt cga tcc tct gaa agc tca tag tat tgg tc	s. 57
59	RF059	ata <u>act agt</u> / tca ggc gtt ccc cgg cgt	inverse PCR mit pEX18Ap[5'- <i>pcpS</i> -3']
60	RF060	ata <u>cat atg</u> / ccc acc agt cac gtg gcg	s. 59
61	RF061	ata <u>cat atg</u> / cgg ttc ggc cag cgg caa	Ampl. der Gentamycinkassette
62	RF062	ata <u>act agt</u> / ccg aac aac tcc gcg gcc	aus pX1918G (f. pΔ <i>pcpS</i>)
63	#1	ata <u>gca tgc</u> / taa tac gac tca cta tag gga gag gaa gta tat aca tgg gag acc gcc ggc ctg	s. 61
64	#2	ata <u>gga tcc</u> / gtc ctg atc agg ttt tgg gag cag cc	f. pQE70[<i>T7-LeuA44A5</i>] T7-Promotor (fett), RBS (kursiv)
65	#3	ata <u>gca tgc</u> / taa tac gac tca cta tag gga gag gaa gta tat aca tgg gag acc gcc gtc atg	s. 63
66	#4/#6	ata <u>gga tcc</u> / ggt taa atc agg ttc cgg caa c	f. pQE70[<i>T7PheA44A5</i>] T7-Promotor (fett), RBS (kursiv)
67	RF067	ata <u>gca tgc</u> / taa tac gac tca cta tag gga gaa gga gag cag cta tgg gag acc gcc ggc ctg gtc	s. 65/68
68	RF068	ata <u>gca tgc</u> / taa tac gac tca cta tag gga gaa gga gag cag cta tgg gag acc gcc gtc atg	f. T7-LeuA T7-Promotor (fett), RBS (kursiv)
69	RF069	ata <u>aag ctt</u> / gcc acg tgc gga acc ggc	f. T7-PheA T7-Promotor (fett), RBS (kursiv), s. 66
70	RF070	ata <u>act agt</u> tta/ ttg cac gcc ggg cag cgc	für Antisense-Konstrukt <i>pcpS</i> in pUCPKS/pUCPSK
71	RF071	ata <u>cc/a tgg aag acg cca</u> aaa aca ta	s. 69
72	RF072	ata <u>aga tct</u> / caa ttt gga ctt tcc gcc	f. pQE60[<i>luc</i>]
73	RF077	gac caa tac tat gag ctt tca gag gcc aga aaa aac gaa ttt ctc gc	s. 72
			f. pTz18R[<i>acpS</i>]K44A

74	RF078	gcg aga aat tcg ttt ttt ctg gcc tct gaa agc tca tag tat tgg tc	s. 77
75	RF079	ata <u>cca tgg</u> / gca cta tcg aag aac gcg tta ag	f. pQE60[<i>acpP</i>] E. coli FAS ACP
76	RF080	ata <u>aga tct</u> / cgc ctg gtg gcc gtt gat	s. 79
77	RF081	tgg aca tta ccg agc tta aag cca tcg cct cta tgg ctg ggc	f. pTz18R[<i>acpS</i>]R14A
78	RF082	gcc cag cca tag agg cga tgg ctt taa gct cgg taa tgt cca	s. 81
79	RF083	tgg aca tta ccg agc tta aaa aga tcg cct cta tgg ctg ggc	f. pTz18R[<i>acpS</i>]R14K
80	RF084	gcc cag cca tag agg cga tct ttt taa gct cgg taa tgt cca	s. 83

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel gilt mein besonderer Dank für das interessante Arbeitsthema. Seine stete Diskussionsbereitschaft und das rege Interesse an meiner Arbeit haben nicht nur häufig neue Projekte initiiert, sondern auch zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Mitgliedern des gesamten Arbeitskreises und der Nachwuchsgruppen danke ich für die angenehme Atmosphäre im Labor und während gemeinsamer Unternehmungen. Besonders die fruchtbare Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen und Hilfestellungen haben den Laboralltag sehr bereichert. Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Thomas Dürfahrt, Martin Hahn, Dr. Thomas Weber und Dr. Andrea Neumüller für die aufbauenden Gespräche und stete Gesangsbereitschaft („4716 singt Deutsch“). Die „alte Garde“ des AK 66, insbesondere Dr. Katrin Eppelmann, Dr. Dirk Schwarzer, Dr. Torsten Stachelhaus, Dr. J. May, Stephan Grünwald und Dr. Uwe Linne haben auch außerhalb des Labors für gute Stimmung gesorgt. Für die fruchtbare Zusammenarbeit möchte ich besonders Dr. Henning Mootz und Dr. Jürgen May, der zusammen mit Dr. Torsten Stachelhaus und Martin Hahn nicht müde wurde diese Arbeit kritisch durchzusehen, danken.

Weiterhin danke ich Dr. Jens Solsbacher (Aventis R&T) mit seinem Labor, Dr. Dirk Konz (Aventis R&T) und Dr. Max Schobert (AK Prof. Dr. Jahn, TU Braunschweig) für die erfolgreiche Kooperation. Der „Perle des Arbeitskreises“, Antje Schäfer, möchte ich für ihre großes Engagement, Eigeninitiative und ihr Interesse an gemeinsamen Projekten danken. Roswhita Roller-Müller gebührt meine Dank für die unermüdliche organisatorische Arbeit.

Meinen Schwiegereltern Heinrich und Maria Walter sowie Hildegard Astroh danke ich für ein stets offenes Ohr und die fortwährende Hilfsbereitschaft, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gebührt Henning Fort und meiner Frau Andrea, die mich durch liebevollen Zuspruch auch in schwierigen Zeiten immer wieder aufgebaut haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.